

Kombinationswirkungen von Vindesin und Röntgenstrahlen
auf die pränatale Entwicklung der Maus
nach in-utero-Exposition während der frühen Organogenese.

Eine makroskopische und zytologische Studie.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II

der Universität Zürich

von

IVAN BALLA

von Winterthur (ZH)

Begutachtet von

Frau Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli

und

Herrn Prof. Dr. V. Ziswiler

Zürich 1986

Zentralstelle der Studentenschaft

Kombinationswirkungen von Vindesin und Röntgenstrahlen
auf die pränatale Entwicklung der Maus
nach in-utero-Exposition während der frühen Organogenese.

Eine makroskopische und zytologische Studie.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von

IVAN BALLA

von Winterthur (ZH)

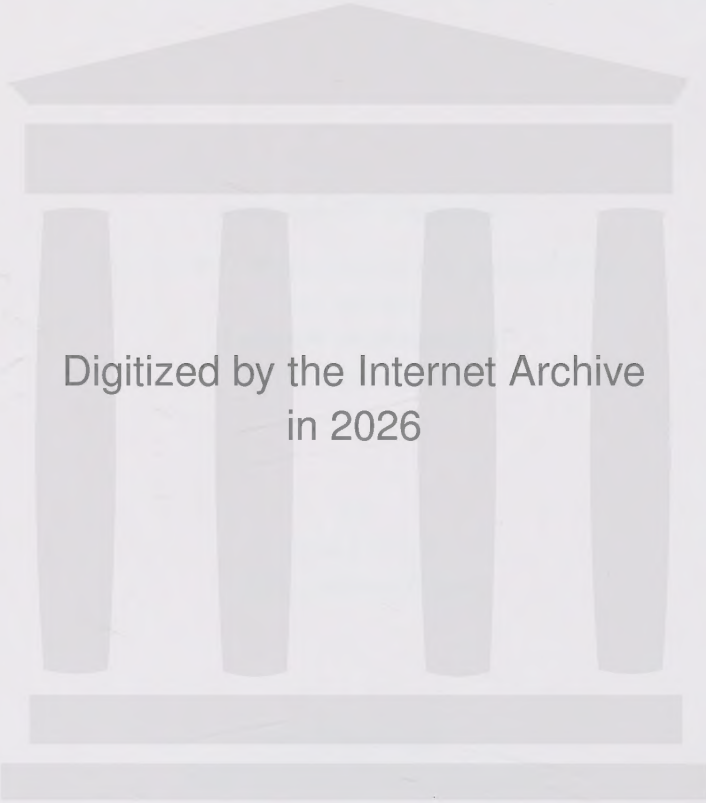
Begutachtet von

Frau Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli
und

Herrn Prof. Dr. V. Ziswiler

Zürich 1986

Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

meiner lieben Schwester Dagmar gewidmet

Frau Professor Dr. Hedi Fritz-Niggli danke ich für die Ueberlassung des interessanten Themas, sowie für ihren fachlichen und menschlichen Beistand. Mit ihrem grossen Einfühlungsvermögen und Engagement hat sie massgeblich dazu beigetragen, dass diese von tragischen Ereignissen begleitete Arbeit erfolgreich beendet werden konnte. Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. V. Ziswiler für die kritische Durchsicht und Begutachtung des Manuskripts.

Zum besonderen Dank bin ich auch Herrn PD Dr. Christian Michel verpflichtet. Ich konnte von seinen langjährigen Erfahrungen im Gebiete der Strahlenembryologie profitieren und er stand mir stets mit vielen wertvollen Ratschlägen und Anregungen beiseite.

Weiterhin danke ich Herrn J. Zehnder für die Hilfe bei der statistischen Datenverarbeitung und Frau B. Lurz für die sorgfältige Erstellung der Computergraphiken. Frau I. Cordt-Riehle sei für die Durchführung der Dosimetrie und Herrn T. Suda für die Beratung in Belangen der Photographie bestens gedankt.

Dem Schweizerischen Nationalfonds möchte ich für die finanzielle Unterstützung der Studie ebenfalls herzlich danken.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	1
I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	5
1. Allgemeines zur Problematik der Wechselwirkungen zwischen Chemikalien und ionisierenden Strahlen	5
2. Fragestellungen	7
3. Eigenschaften und Wirkungen der untersuchten Agenzien	8
3.1. Vindesin	8
3.2. Röntgenstrahlen	14
4. Untersuchungssystem: frühembryonale Augenanlage als biologischer Indikator von primären Schädigungsmechanismen und Erholungspotenzen	17
II. MATERIAL UND METHODEN	21
1. Versuchstiere und Tierhaltung	21
2. Paarung und Konzeptionsbestimmung	21
3. Agenzien	22
3.1. Vindesin	22
3.2. Röntgenstrahlen	22
4. Die makroskopische Analyse	24
4.1. Versuchsanordnung	24
4.2. Auswertung	24
4.3. Statistik	26
5. Die histologische Analyse der Augenanlagen	27
5.1. Versuchsanordnung	27
5.2. Herstellung von Präparaten	28
5.3. Auswertung	28

	Seite
5.3.1. Charakteristika der untersuchten Anlagen und Auswertungszonen	28
5.3.2. Untersuchungskriterien	30
5.4. Statistik	32
III. RESULTATE	33
1. Die makroskopische Analyse	33
1.1. Behandlung am Tag 9 der Gestation	33
1.1.1. Mortalität	33
1.1.2. Abnormität	35
1.1.3. Wachstumshemmung	37
1.1.4. Missbildungen	39
1.1.5. Gesamtschädigung	42
1.2. Behandlung am Tag 8 der Gestation	43
1.2.1. Mortalität	43
1.2.2. Abnormität	46
1.2.3. Wachstumshemmung	49
1.2.4. Missbildungen	51
1.2.5. Gesamtschädigung	56
2. Die histologische Analyse der Augenanlagen	58
2.1. Mitoseaktivität	58
2.1.1. Untersuchungen 4 Stunden nach Behandlung	58
2.1.2. Untersuchungen 12 Stunden nach Behandlung	60
2.1.3. Untersuchungen 24 Stunden nach Behandlung	63
2.2. Verteilungsmuster der einzelnen Mitosestadien	67
2.2.1. Untersuchungen 4 Stunden nach Behandlung	67
2.2.2. Untersuchungen 12 Stunden nach Behandlung	70
2.2.3. Untersuchungen 24 Stunden nach Behandlung	72

	Seite
2.3. Zelltod	73
2.3.1. Untersuchungen 4 Stunden nach Behandlung	73
2.3.2. Untersuchungen 12 Stunden nach Behandlung	78
2.3.3. Untersuchungen 24 Stunden nach Behandlung	82
2.4. Phagozytose	87
2.4.1. Untersuchungen 4 Stunden nach Behandlung	87
2.4.2. Untersuchungen 12 Stunden nach Behandlung	90
2.4.3. Untersuchungen 24 Stunden nach Behandlung	92
IV. DISKUSSION	95
1. Makroskopische Befunde	95
2. Histologische Befunde	108
V. LITERATURVERZEICHNIS	121
TABELLEN	141
ABBILDUNGEN	177

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine makroskopische und zytologische Studie der Kombinationswirkungen von Vindesin, einem Zytostatikum aus der Reihe der Vinca Alkaloide, und Röntgenstrahlen auf die frühe Organogenese der Maus (Tag 8 und 9) durchgeführt.

Im makroskopischen Teil der Arbeit wurden verschiedene Konzentrationen des Chemikali-ums auf ihre strahlenmodifizierende Wirkung hin geprüft. Zudem interessierte die Abhängigkeit der Reaktion vom Entwicklungsstadium.

Die zytologische Analyse beschäftigte sich mit der antimitotischen und zell-letalen Wirkung der beiden Noxen auf die Neuroblasten von frühembryonalen Augen (Tag 9) in Abhängigkeit vom Untersuchungsintervall. Es wurden Informationen gewonnen über die primären Schädigungs-mechanismen und Erholungspotenzen des präneurales Gewebes, sowie über die zell-kinetischen Ursachen der Wechselwirkungen zwischen dem Zytostatikum und ionisierenden Strahlen.

Die grob-morphologische Analyse der Embryotoxizität von Vindesin (Desacetyl-Vinblastinamid-Sulfat, Abk. VDS) zeigte eine dosis- und stadiumabhängige Schädigungspotenz des Chemika-liums während der frühen Organogenese. Im niedrigeren Dosierungsbereich (0.25 und 0.35 mg/kg) löst das Zytostatikum einzig eine Reduktion der Körpergrösse aus, während höhere Konzentrationen (0.5 und 1.0 mg/kg) neben Wachstumsretardationen und Missbildungen vor allem eine frühe Resorption der Implantate herbeiführen.

Das jüngere Entwicklungsstadium (Tag 8) reagiert deutlich weniger empfindlich auf Vindesin als das ältere. So ist nach Applikation von 0.35 mg/kg VDS lediglich das Total an missgebil-deten und wachstumsgehemmten Feten (Abnormitätsrate) signifikant höher als bei der Kontrolle. Ebenfalls ist gegenüber Tag 9 die Letalitätswirkung von 0.5 mg/kg VDS nur halb so gross. Die nach der Verabreichung von 1.0 mg/kg VDS als einzige Reaktion erfolgenden massiven Postimplantationsverluste widerspiegeln eine Alles-oder-Nichts Wirkung des Chemikali-ums im höheren Dosierungsbereich.

Als stadiumspezifisch erwies sich auch das Auftreten bestimmter Missbildungsformen. So wer-den Anomalien wie Mikrophthalmie und Hypodaktylie einzig am Tag 9, jene wie Mikrotie und Nieren-Hypoplasie jedoch ausschliesslich am Tag 8 induziert. Die teratogene Wirkung des Zyto-statikums betrifft vorwiegend die Extremitäten (Hypodaktylie und Polydaktylie), während Gehirn- und Augendefekte nur selten vorkommen.

Die embryotoxische Wirkung von 0.9 Gy Röntgenstrahlen während der frühen Organogenese

erwies sich als strikt stadium- und reaktionsspezifisch. Die Bestrahlung 8-tägiger Embryonen führte zu einer 4,5-mal höheren Anomalienrate als die Exposition am Tag 9 der Gestation. Betroffen wurde fast ausschliesslich die Region des zentralen Nervensystems und der Augen. Die hohe Inzidenz an Exenzephalien in der am Tag 8 exponierten Gruppe ist damit erklärbar, dass ionisierende Strahlen das Schliessen der beiden Neuralwülste verhindern.

Bei der Untersuchung der Kombinationswirkungen war es von besonderem Interesse zu erfahren, ob sich die Strahlenwirkung durch Zugabe nicht-toxischer Dosen des Vindesins modifizieren lässt. Das Zytostatikum erwies sich als ein wirksamer Strahlensensibilisator mit einer strengen Stadium- und Reaktionsspezifität. So potenzieren niedrige Vindesin-Konzentrationen (0,25 und 0,35 mg/kg) den Strahlenschaden mit 0,9 Gy einzig am Tag 8 und nur in bezug auf das Kriterium "Teratogenität". Die Vorbehandlung mit 0,25 mg/kg steigert die strahlenbedingte Missbildungsrate um einen Faktor von 1,7, diejenige mit 0,35 mg/kg VDS hingegen bereits um einen Faktor von 2,4.

Die zytologische Studie zeigte markante Änderungen der Reaktionsweise der Neuroblasten auf die einfache oder kombinierte Applikation von Vindesin und Röntgenstrahlen je nach dem Untersuchungszeitpunkt und -kriterium.

Die zellteilungshemmende Wirkung des Vindesins hält während der gesamten Untersuchungsperiode von 24 Stunden zwar an, verringert sich jedoch mit zunehmender Zeit nach Applikation immer mehr.

Der zeitliche Ablauf des Vindesin-induzierten Zelltodes unterscheidet sich beträchtlich von jenem der Proliferationshemmung. Das erst nach einer Latenzzeit von 12 Stunden erfolgende massive Zellsterben zeigt, dass die Letalitätswirkung von VDS mit einer bestimmten Aufenthaltsdauer im Primordium verbunden ist. Einen halben Tag später sinkt der Nekroseanteil im exponierten Gewebe, ein Zeichen für die Erholungsfähigkeit des Testsystems.

Die ionisierenden Strahlen bewirkten 4 Stunden nach Exposition eine maximale Hemmung der Zellteilungsaktivität. Obwohl die Mitosereduktion stärker ausgeprägt war als nach Abgabe des Zytostatikums, erholte sich das Augenprimordium bedeutend schneller (innerhalb von 12-24 Stunden) vom Strahlenschaden als vom Vindesin-bedingten Mitoseblock.

Anders als nach Vindesin-Behandlung kommt es bereits 4 Stunden nach Bestrahlung zum akuten Zelltod. Trotz der anfänglich massiven Strahlennekrose erfolgt innerhalb der kurzen Zeit von 8 Stunden eine vollständige Erholung der geschädigten Augenpartien. Diese Befunde liefern

einen eindrucklichen Beweis für die besondere Regenerationskapazität früher Augenanlagen.

Eine Wechselbeziehung zwischen den verwendeten Noxen in bezug auf das Kriterium "Mitoseaktivität" liess sich einzig 24 Stunden nach Behandlung nachweisen. Die Bestrahlung der mit Vindesin vorbehandelten Tiere verdoppelte die antimitotische Wirksamkeit des Zytostatikums. Der Kombinationseffekt widerspiegelt dabei eine synergistische Interaktionsweise der beiden Agenzien.

Demgegenüber erwies sich Vindesin in bezug auf das Kriterium "Zelltod" während einer beschränkten Zeitspanne von 4 Stunden nach Behandlung als ein wirksamer Strahlensensibilisator. Das Chemikaliuim potenzierte den Anteil an Strahlennekrose um einen Faktor von 1.8. Im Gegensatz dazu wird während der nachfolgenden Untersuchungsintervalle die starke Zytoletalität des Chemikaliuims infolge der antagonistischen Interaktion mit Röntgenstrahlen weitgehend abgebaut. Die Ursachen der verschiedenen Interaktionsmodalitäten werden diskutiert.

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1. Allgemeines zur Problematik der Wechselwirkungen zwischen Chemikalien und ionisierenden Strahlen.

Im medizinischen Bereich kommt es immer häufiger zur kombinierten Anwendung von Pharmaka und energiereicher Strahlung für diagnostische und therapeutische Zwecke. Insbesondere in der Strahlentherapie von malignen Krankheiten werden Versuche unternommen, die Sterblichkeitsrate von Tumorzellen durch Zugabe von Chemikalien, unter anderem von Zytostatika, zu erhöhen. Das Hauptziel einer solchen Behandlungsmodalität ist eine effizientere Vernichtung maligner Zellpopulationen. Daneben sollte auch der Schutz des normalen Gewebes angestrebt werden (BARENDSSEN, 1981). Dies könnte im Idealfall dadurch erreicht werden, indem die Empfindlichkeit von Krebszellen auf die zytotoxische Wirkung eines Agens durch die Gegenwart eines anderen gesteigert wird (Sensibilisierung), während gleichzeitig das umliegende gesunde Gewebe unter Mitwirkung eines *Schutzstoffes* unbeschädigt bleibt.

Die theoretische Modalität der Wechselbeziehungen zwischen Strahlung und Chemikalien wurde von verschiedenen Autoren (u.a. STEEL, 1979; MAGDON, 1980; HILL und BELLAMY, 1984; STREFFER UND MUELLER, 1984) diskutiert.

Nach UNSCEAR (1982) können je nach dem, ob beide oder nur eines der einzeln applizierten Agenzien wirksam sind, im Prinzip 2 Klassen von Kombinationswirkungen unterschieden werden:

1. Klasse (beide Agenzien wirksam):

- Additivität: Endeffekt der Kombinationsbehandlung gleich Summe der Wirkungen zweier unabhängig voneinander wirkenden Agenzien.
- Synergismus: Der Kombinationseffekt ist grösser als die Summe der Einzelwirkungen der beiden Agenzien. Man spricht auch von Potenzierung, oder Supra- bzw. Ueberadditivität.
- Antagonismus: Der Kombinationseffekt ist *kleiner* als die Summe der Einzelwirkungen integrierender Agenzien.

2. Klasse (nur eines der beiden Agenzien aktiv):

Wird durch die Zugabe des *inaktiven* Agens die Toxizitätswirkung des anderen verstärkt oder abgeschwächt, so werden die Begriffe Synergismus und Antagonismus durch Sensibilisierung

und Schutzwirkung ersetzt.

Die möglichen Wechselwirkungen zwischen diversen Zytostatika und ionisierenden Strahlen sind anhand verschiedenster Experimente getestet worden (siehe Zusammenstellung von BELLAMY und HILL, 1984). Untersucht wurden unter anderem Substanzen wie Actinomycin D, Adriamycin, Bleomycin, Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil, Nitrosohamstoff, Platin-Verbindungen, Vinca Alkaloide und Röntgenstrahlen.

Ueber die *Mechanismen* der Interaktionen zwischen Strahlung und Pharmaka ist noch nicht viel bekannt. Wie STREFFER und MUELLER (1984) betonen, wäre insbesondere die Evaluation von Umständen, unter welchen eine *Potenzierung* von Strahleneffekten durch Chemikalien stattfindet, von grösstem Nutzen. Die Art und Weise, wie die Zellen auf einfache oder kombinierte Verabreichung von Strahlen und Zytostatika reagieren, ist nicht nur vom behandelten Zelltypus abhängig, sondern auch vom jeweiligen Zellzyklus-Stadium und Proliferationsstatus (BARENDSSEN, 1981). Als auslösender Mechanismus für Zelltod-Potenzierung nach Interaktion zwischen zwei Agenzien wird von HILL und BELLAMY (1984) eine Kumulation diverser Intrazellulärschäden vermutet.

Wie im UNSCEAR-Report von 1982 hervorgehoben wurde, sollte die Art und Weise der Wechselwirkungen möglichst an verschiedenen biologischen Systemen getestet werden. Das embryonale System eignet sich in mehrfacher Hinsicht für das Prüfen verschiedener Substanzen auf ihre strahlenmodifizierende Eigenschaften. Der vorgeburtliche Organismus zeichnet sich durch eine ausgesprochene Empfindlichkeit gegenüber Strahlen und Chemikalien aus, wodurch selbst Wirkungen geringer Dosierungen nachweisbar sind. Zudem bestehen hinsichtlich metabolischer Funktionen, Proliferation, Immunabwehr (TA-1-Antigen), Energiegewinnung (Glykolyse) und Zellmobilität viele Ähnlichkeiten zwischen embryonalen Zellen und Tumorzellen (siehe auch BOLANDE, 1973). Dies erlaubt, die aus den embryotoxischen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse auch auf den klinischen Bereich zu übertragen.

Die Suche nach synergistischen Reaktionen zwischen Pharmaka und Strahlung während der Pränatalentwicklung umfasst zudem auch die Aspekte des Strahlenschutzes und der Strahlensicherheit. Insbesondere während der höchstempfindlichen Organbildungsphase kann mit der Möglichkeit einer gleichzeitigen Exposition mit mehreren Noxen gerechnet werden, da das Vorliegen einer Schwangerschaft oft erst zu einem späteren Zeitpunkt realisiert wird. Die äusserst wichtige Frage nach supra-additiven Kombinationswirkungen zwischen Pharmaka und

Strahlung ist dennoch nur von wenigen Arbeitsgruppen angegangen worden. Tierexperimentell wurde bisher bei folgenden chemotherapeutischen Substanzen eine strahlenverstärkende Wirkung auf den Embryo nachgewiesen:

- in vitro: Actinomycin D (STREFFER et al., 1978), Koffein (MUELLER et al., 1983 b, 1985).
- in vivo: Kortison (WOOLLAM et al., 1959), Ledermycin (FRITZ-NIGGLI und MICHEL, 1971), Reverin (FRITZ-NIGGLI et al., 1974), Lucanthion (MICHEL, 1974; FRITZ-NIGGLI und MICHEL, 1976), Koffein (YIELDING et al., 1976; NOMURA, 1977; KUSAMA und YOSHIZAWA, 1984), Chloroquin (YIELDING et al., 1976) und Misonidazol (MICHEL und FRITZ-NIGGLI, 1981; MICHEL et al., 1983).

2. Fragestellungen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit folgenden Fragestellungen:

- Art und Weise der Wechselbeziehungen zwischen dem Zytostatikum Vindesin und Röntgenstrahlen auf die vorgeburtliche Entwicklung der Maus in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanz und vom Entwicklungsstadium (Späteeffekte).
- Interaktionen der verwendeten Noxen hinsichtlich deren antimitotischen und zell-letalen Eigenschaften auf das primordiale Augengewebe in Abhängigkeit vom Untersuchungsintervall (Frühwirkungen).
- Einfluss der jeweiligen Behandlung auf das Repairvermögen des untersuchten Gewebes (Aktivierung oder Hemmung embryonaler Erholungsprozesse) mittels genauer Evaluation phagozytärer Reaktionen.
- Mögliche Korrelationen zwischen den Kriterien Mitoseaktivität, Zelltod und Phagozytose nach einfacher und kombinierter Applikation beider Agenzien.
- Zellkinetische Ursachen der beobachteten zytologischen Veränderungen und Zusammenhänge zwischen den primären Schädigungsmechanismen von Vindesin und/oder Strahlung und späten makroskopischen Effekten.

3. Eigenschaften und Wirkungen der untersuchten Agenzien.

3.1. Vindesin

Chemische Struktur

Vindesin (Desacetyl-Vinblastinamid-Sulfat, VDS) gehört zusammen mit Vincristin (VCR) und Vinblastin (VBL) zu der Gruppe der sogenannten Vinca Alkaloide. Während die beiden letztgenannten Substanzen direkt aus der Pflanze *Vinca rosca* (Immergrün) extrahiert werden, ist Vindesin als ein Derivat des Vinblastins ein semi-synthetisches Alkaloid (BRADE, 1981). Alle Vinca Alkaloide haben asymmetrische dimerische Moleküle, wobei insbesondere Vinblastin und Vincristin strukturell einander sehr ähnlich sind (GERZON, 1980; ROSENTHAL, 1981).

Onkolytische Eigenschaften

Die Vinca Alkaloide werden als wichtige onkolytische Wirkstoffe allein oder in Kombination mit anderen Agenzien bei der Behandlung bestimmter Leukämien und Solidtumore eingesetzt. Trotz der Ähnlichkeit ihrer chemischen Struktur bestehen teilweise recht grosse Unterschiede in der biologischen Aktivität (GOLDHIRSCH et al., 1980). Der antineoplastische Wirkungsbereich des Vindesins ist breiter als bei Vinblastin und gleicht eher demjenigen von Vincristin (DYKE und NELSON, 1977). Bisher erwies sich Vindesin als effizient gegen lymphatische und nichtlymphatische Leukämien, maligne Melanome, Bronchialkarzinome, sowie bei der Therapie des Mammakarzinoms (DYKE und NELSON, 1977; BRADE, 1981; DIBELLA et al., 1984; GOLDHIRSCH et al., 1980; MILLER et al., 1980; HANSEN und BRINCKER, 1984). Tierexperimentell wurde ein ähnlich breites antineoplastisches Wirkungsspektrum des Vindesins ermittelt wie im klinischen Bereich. In vivo-Versuche an Mäusen und Ratten (SWEENEY et al., 1978) zeigten eine dosisabhängige Wirksamkeit von VDS gegen Melanome, Sarkome, Leukämien, Aszites-Tumore und Brustkrebs. In einer kürzlich durchgeführten Vergleichsstudie der Antitumorpotenz der drei Vinca Alkaloide (in vitro) wirkte Vindesin deutlich stärker als Vincristin und Vinblastin (JORDAN et al., 1985).

Nebenwirkungen

Als Nebenwirkungen der Vindesin-Therapie wurden bisher beobachtet: Leukopenie, Thrombozytopenie, Anämie, Darmschleimhautatrophie, Haarausfall, Neutropenie und Neurotoxizität. Insbesondere die zwei zuletzt genannten Nebenerscheinungen werden als dosislimitierende

Eigenschaften betrachtet und zwingen zur Dosisreduktion oder Verlängerung der Dosierungsintervalle (GOLDHIRSCH et al., 1980). Das Phänomen der kumulativen Neurotoxizität stellt offensichtlich ein gravierendes Problem bei der Applikation von VDS dar, wie auch zahlreiche Publikationen unterstreichen (BRADE, 1981; MINTON et al., 1981; SHAPIRO und YOUNG, 1984). Die klinische Neurotoxizität des Vindesins ähnelt in Qualität und Sequenz der Symptome derjenigen von Vincristin, wobei die meist höhere Dosierung des ersterwähnten Alkaloids in der Therapie auch ausgedehntere Neuropathien mit sich bringt (SHAPIRO und YOUNG, 1984).

Interessanterweise fanden TODD und Mitarbeiter (1976) bei Maus, Ratte und Hund keine Anzeichen für funktionelle oder strukturelle Veränderungen des Neuralgewebes nach i.v. Injektion von Vindesin. Als chronisch toxische Nebenwirkungen wurden registriert: Leukopenie, Anämie, Darmschleimhautatrophie und Hemmung der Spermatogenese. Die akute Toxizität manifestiert sich in Gastroenteritis mit Schleimhautatrophie, Dehydration und Knochenmarkdepression, sowie Infektionen (DYKE und NELSON, 1977).

Allgemein gilt für die Toxizität der Vinca Alkaloide im Tierversuch die Reihenfolge Vincristin > Vindesin > Vinblastin. Bei der Maus beträgt die LD_{50} (Letaldosis 50 %) nach einmaliger intravenöser Injektion von VDS 6.3 mg/kg (bei der Ratte 2.0 mg/kg, TODD et al., 1976).

Pharmako-kinetische Eigenschaften

Was die pharmako-kinetischen Eigenschaften des Vindesins anbelangt, so wurde dessen ausgeprägte, reversible Gewebsbindung, sowie die rasche Eliminierung aus dem Plasma nachgewiesen (GOLDHIRSCH et al., 1980). Vergleichende pharmako-kinetische Studien der Vinca Alkaloide an krebserkrankten Patienten (NELSON et al., 1980) zeigten, dass 20 Stunden nach der Applikation von VDS noch etwa 30 %, nach 40 Stunden lediglich 15 % und nach 80 Stunden praktisch 0 % der ursprünglich abgegebenen Menge im Körper vorhanden war. Die rasche Ausscheidung des Zytostatikums erfordert deshalb eine mehrfache Dosierung oder eine kontinuierliche Infusion.

Eingehende Untersuchungen der Verteilung in Gewebe, der Anreicherung im Blut, sowie der Ausscheidung von Vindesin wurden von CULP et al. (1977) bei der Ratte durchgeführt. Am meisten wurde das Zytostatikum in der Milz aufgenommen, während das ZNS sowie Thymus und Testes eher geringe Menge an VDS enthielten. Die Ausscheidung des Chemikali-ums

erfolgte grösstenteils via Galle.

Ein wichtiger Faktor bei der Evaluation der Embryotoxizität von chemischen Substanzen ist deren Anreicherung im mütterlichen Blut. Bei der Ratte zeigten die Messungen des VDS-Spiegels im Blut ansteigende Werte bis zu 8 Stunden nach i.v. Applikation, ab 16 Stunden hingegen Abnahme auf die Hälfte der Anfangsmenge, und nach 48 Stunden schliesslich ein Absinken des VDS-Spiegels auf die Null-Ebene (CULP et al., 1977).

Wirkungsmechanismen

Die primären Mechanismen, durch welche die Vinca Alkaloide Zellen in vivo und in vitro schädigen, sind noch nicht abgeklärt. Bekannt ist, dass durch eine Anlagerung an das monomere Protein Tubulin dessen Polymerisation zur Mitosespindel verhindert und dadurch die Zellteilung auf dem Metaphasen-Niveau arretiert wird. Diese Art der Antiproliferationswirkung, nach PRITCHETT et al. (1985) auch *stathmokineticische Wirkung* genannt, übt Vindesin eher in kleineren Dosierungen aus (GOLDHIRSCH et al., 1980). Die Effizienz der Proliferationshemmung durch VDS ist ausser von dessen Bindungsstärke an Tubulin auch von der Eintrittsrate von Zellen in die Mitose und von der sich im Mitosezyklus befindender Zellzahl zum Applikationszeitpunkt abhängig (SWEENEY et al., 1978).

An verschiedenen Tumor-Modellen äusserte sich die "Spindelgift-Eigenschaft" der Vinca Alkaloide zudem in Effekten wie Postmetaphase-Nekrose, Metaphasenaberrationen und Polyploidie (ROEHRBORN und BASLER, 1981). Da Mikrotubuli nicht nur an der Chromosomalbewegung während der Zellteilung beteiligt sind, sondern u.a. auch am Aufbau des Zytoskelettes, an der Mitochondrienbewegung, am axoplasmatischen Transport innerhalb der Neurone, sowie an der Bewegungs- und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen (BRADE, 1981; ROSENTHAL, 1981), können die Vinca Alkaloide alle diese zellulären Prozesse beeinträchtigen. Insbesondere die Hemmung einer gerichteten Migration von Krebszellen durch Zerfall des zytoplasmatischen Mikrotubuli-Komplexes repräsentiert einen neuen Aspekt der onkolytischen Aktivität von Vinca Alkaloiden (STORME et al., 1981). Eine Alternativhypothese zur Erklärung des Antimitoseeffektes der Vinca Alkaloide lieferten GIETZEN et al. (1980) durch den Nachweis, dass Vindesin den Calmodulin-abhängigen Kalzium-Transport im Bereiche der zentrosomalen Mitosespindel zu hemmen vermag.

In höheren, therapeutischen Dosen entfaltet Vindesin einen maximalen *letal* Effekt auf die Zellen während der S-Phase (GOLDHIRSCH et al., 1980; HILL UND WHELAN, 1981). Der

Interphasentod reflektiert die nicht-mitotischen Wirkungen des Vindesins auf Tubulin, Plasmamembran (z.B. Veränderungen der Phospholipidzusammensetzung), Zellulärtransport, zyklischen Nukleotid-Metabolismus, sowie RNA und DNA Synthese (HOWARD et al, 1980; SHEPPARD, 1980; CREASEY, 1981; JORDAN et al., 1985).

Die zytotoxische Wirksamkeit des Alkaloids steigt mit dessen zunehmender Konzentration und Expositionsdauer. Die Dosis- und Zeitabhängigkeit des zytotoxischen Effektes ist zudem gewebs- und tumorspezifisch (BRADE, 1981). Nach HANSEN und BRINCKER (1984) ist allerdings weniger die Länge der Exposition als die Konzentration des Chemotherapeutikums für das Letalitätsausmass ausschlaggebend. Gegenwärtig ist noch weitgehend unklar, bis zu welchem Grade die Zytotoxizität der Vinca Alkaloide auf deren Interaktionen mit Tubulin und Mikrotubuli zurückzuführen ist. Zumindest konnte keine direkte Korrelation zwischen der antineoplastischen Wirksamkeit und der Bindungsstärke dieser Pflanzenalkaloide an Tubulin nachgewiesen werden (GERZON, 1980).

Embryotoxische Wirkungen

Die Bedeutung der Zellteilungen und der Mikrotubuli für embryonales Wachstum, morphogenetische Vorgänge und Formänderungen von Zellen machen die Vinca Alkaloide auch für teratologische Untersuchungen interessant (NOACK, 1972). Für Vindesin existieren bis anhin weder experimentelle noch klinische Daten. Bei den verwandten Alkaloiden Vinblastin und Vincristin hingegen wurde im Tierversuch eine schädigende Wirkung auf die pränatale Lebensphase nachgewiesen. Makroskopische in vivo-Studien, die sich mit entwicklungsstörenden Einflüssen von VCR oder VBL auf verschiedene vorgeburtliche Stadien der *Maus* (COHLAN et al., 1964; JONEJA und UNGTHAVORN, 1969; OHZU und SHOJI, 1965; JONEJA und LELIEVER, 1974; WAN et al., 1983; SVOBODA und O'SHEA, 1984), der *Ratte* (COHLAN et al., 1964; DE MYER, 1964, 1965; COHLAN und KITAY, 1965; TAMAKI et al., 1967), des *Hamsters* (FERM, 1963) und des *Affen* (COURTNEY und VALERIO, 1968) beschäftigten, zeigten ein breites Teratogenitätsspektrum, sowie wachstumshemmende und embryoletale Wirkungen.

Ebenfalls erbrachten in vitro-Untersuchungen an verschiedenen Tierspezies wie Hühnchen (BURDMAN, 1966), Amphibien (*Rana pipiens*, FRANCOEUR und WILBER, 1968), Hydra (CHUN et al., 1983), *Drosophila* (WOLSKY, 1983) und *Maus* (SIRACUSA et al., 1980; NARUSE et al., 1983; SVOBODA und O'SHEA, 1984) den Nachweis für Schädigung des embryonalen Testsystems nach Applikation der beiden Alkaloide.

Das bei den Nagetieren vorgefundene Missbildungsmuster umfasst Dysmorphien wie Himanomalien (Enzephalozele, Exenzephalie, Mikrozephalie und Hydrozephalie), Augenstörungen (Mikrophthalmie und Anophthalmie), Hasenscharte, Wolfsrachen, Agnathie, Mikrognathie, Mikrotie, Otozephalie, Umbilikalhernien, Extremitätendefekte (Polydaktylie, Syndaktylie, Brachydaktylie) und diverse Skelettmissbildungen. Als spezifisch durch Vincristin induzierte Abnormitätsformen sind Synpodie (Verschmelzung) der Hinterextremitäten bei Maus und Ratte (JONEJA und UNGTHAVORN, 1969; TAMAKI et al., 1967), Kranioschisis, Analatresie und Missbildungen des Genitalfortsatzes bei der Ratte (TAMAKI et al., 1967) sowie Spina bifida beim Hamster (FERM, 1963) zu nennen. Die Expressivitätsform und das quantitative Ausmass der Toxizitätswirkung der Vinca Alkaloide werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie Tierart, genetische Konstitution, behandeltes Entwicklungsstadium, Dosierung (Verabreichungsart und Konzentration), Konzentrationsfaktoren im Embryo, Plazentalbarriere, Metabolisierung durch den mütterlichen Organismus und Umweltsbedingungen (Ernährung, Stress etc.).

Als besonders empfindlich für morphologische Schädigungen durch die Vinca Alkaloide haben sich bei der Maus die Entwicklungsstadien am Tag 7 und 8 der Gestation erwiesen (NOACK, 1972; JONEJA und LELIEVER, 1974; SVOBODA und O'SHEA, 1984). Zu diesem Zeitpunkt (frühe Organogenese) ist eine Plazenta mit ihrer entsprechenden Barrierefunktion noch nicht vollständig ausgebildet und die vorwiegend undifferenzierten Embryonalzellen befinden sich im Zustand höchster Vermehrungsaktivität.

Im klinischen Bereich wurden keine Anomalien bei Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft einer Antitumorthherapie mit Vinblastin ausgesetzt worden sind, festgestellt (ARMSTRONG et al., 1964; LACHER, 1964; ROSENZWEIG et al., 1964).

Zelluläre Wirkungsmechanismen auf die vorgeburtliche Lebensphase

Neben makroskopischen Effekten beschäftigten sich verschiedene Autoren auch mit den Aspekten der *zellulären* Schädigungsmechanismen von Vincristin und Vinblastin auf die vorgeburtliche Lebensphase der *Maus* (COHLAN et al., 1964; UNGTHAVORN und JONEJA, 1969; NOACK, 1972; JONEJA und LELIEVER, 1973; SIEBER et al., 1978; SVOBODA und O'SHEA, 1984), der *Ratte* (COHLAN und KITAY, 1965; CARPENTIERI und WILLIAMS, 1968; NOACK, 1971; TAKEUCHI et al., 1977 b; TAKEUCHI und TAKEUCHI, 1981) und des *Hamsters* (FERM, 1964). Dabei wurden die Reaktionen des Embryonalgewebes auf die Zytostatika in mehreren und zeitlich verkürzten Untersuchungsintervallen (meist stündlich nach Behandlung) analysiert. Dadurch gewinnt man Informationen betreffend möglicher Ursachen

bzw. Pathogenese der äusserlich sichtbaren Entwicklungsstörungen, sowie Erholungspotenzen des betroffenen Organismus.

Untersucht wurden zytologische Effekte wie Mitoschemmung (Metaphasen-Effekt), Chromosomenstörungen, Zelltod, Phagozytose, Histopathologie und Intrazellulärschäden (EM-Studien). Dabei trat eine Anhäufung der Metaphasen als Zeichen des blockierten Mitosezyklus am häufigsten in Erscheinung. Die zytogenetische Schädigung durch die Vinca Alkaloide äusserte sich in extremer Kondensierung, Verklumpung und Fragmentierung des Chromatinmaterials (COHLAN und KITAY, 1965; NOACK, 1972; TAKEUCHI et al., 1977 b), Ana- und Telophasenbrücken (JONEJA und LELIEVER, 1973) und in numerischen Störungen wie Hypo- oder Hyperploidie (SIEBER et al., 1978). Weiterhin bewirkten die beiden Pharmaka Veränderungen der Zellform (SVOBODA und O'SHEA, 1984) sowie vermehrtes Absterben von Embryonalzellen (COHLAN und KITAY, 1965; UNGTHAVORN und JONEJA, 1969, TAKEUCHI und TAKEUCHI, 1981). Bei der Suche nach Ursachen des Interphasentodes wurden elektronenmikroskopisch eine Erweiterung der Kernmembran und des endoplasmatischen Retikulum, Fragmentierung der Nukleoli, sowie eine verminderte Zahl von Ribosomen und Polysomen ermittelt (NOACK, 1972; TAKEUCHI und TAKEUCHI, 1981). Besonders schwerwiegende Konsequenzen für die Intrauterinentwicklung bringt die Zerstörung des embryonalen Gewebsaufbaus durch die Vinca Alkaloide mit sich (TAKEUCHI und TAKEUCHI, 1981).

Anbetracht der Vielzahl möglicher primärer Wirkungsmechanismen ist es äusserst schwierig zu bestimmen, welche Initialschäden als Ausgangspunkt für bestimmte embryotoxische Reaktionen auf der makroskopischen Ebene in Frage kommen. Nach COHLAN und KITAY (1965) spielt sicherlich die Mitoschemmung (Metaphasen-Effekt) bei der Entstehung von Embryopathien eine zentrale Rolle. Studien, welche sowohl die zytologischen wie auch makroskopischen Veränderungen nach Applikation der Vinca Alkaloide untersuchten, konnten allerdings keine direkte Beziehung zwischen den beiden Toxizitätsformen nachweisen (FERM, 1964; NOACK, 1972; SIEBER et al., 1978).

Kombinationswirkungen mit ionisierenden Strahlen

Was die Kombinationswirkungen der Vinca Alkaloide mit ionisierender Strahlung auf die pränatale Lebensperiode anbelangt, so sind bis anhin weder experimentelle noch klinische Angaben vorhanden.

Im klinischen Bereich werden Vinblastin und Vincristin bereits recht häufig zusammen mit

verschiedenen Strahlenarten bei der Behandlung maligner Krankheiten eingesetzt (LEIMERT et al., 1979; GRDINA und WHITE, 1983; WEICK et al., 1983; ROSSO et al., 1984; HOLOYE et al., 1985). Für Vindesin ist ein ähnlicher Behandlungsmodus bisher allerdings nicht bekannt. Die kombinierte Anwendung von Vinca Alkaloiden mit Strahlung bezweckt eine Synchronisierung der Tumorzellen nach Vorbehandlung mit dem Antimitotikum (Arretierung auf dem Metaphasen-Niveau). Die Strahlenexposition erfolgt nach BELLAMY und HILL (1984) dann zu einem Zeitpunkt, während dem die aus dem Metaphasen-Block entlassenen Zellen in die strahlenempfindliche G_1 -Phase eingetreten sind.

Die wenigen tierversperimentellen Untersuchungen, die sich mit Auswirkungen einer gemeinsamen Applikation von Vinca Alkaloiden und ionisierenden Strahlen auf Krebszellen (PEREZ und OLSON, 1969; WODINSKY et al., 1974; BARENDSEN und JANSE, 1978; KAL et al., 1979; KAL und BARENDSEN, 1980) oder Darmzellen (MOORE et al., 1982) befassten, zeigten eine Wirkungsverstärkung im Kombinationsversuch gegenüber Separatanwendung. Diese Reaktionssteigerung hängt vom Intervall zwischen der Applikation beider Agenzien sowie von der Reihenfolge deren Verabreichung ab. Eine Addition und sogar Potenzierung der Einzelwirkungen wurden zwar beschrieben, eindeutige Aussagen konnten jedoch nicht gemacht werden.

3.2. Röntgenstrahlen

Wirkungen während der Pränatalentwicklung

Im Gegensatz zu Chemikalien können ionisierende Strahlen *direkt* auf den vorgeburtlichen Organismus wirken. Die applizierte Strahlenmenge verteilt sich homogen im exponierten Embryo, und die absorbierte Dosis lässt sich genau quantifizieren. Dadurch können die experimentellen Daten viel besser auf den Menschen übertragen werden (BRENT, 1984).

Die Art und Häufigkeit von strahlenbedingten Entwicklungsstörungen hängt von einer Vielzahl an biologischen und physikalischen Parametern ab, wie Entwicklungsstadium, Dosishöhe, Dosisrate, Strahlenqualität (LET), Applikationsart (protrahierte, akute, fraktionierte Bestrahlung), Milieufaktoren sowie Intervall zwischen Bestrahlung und Beobachtung.

Auf der makroskopischen Ebene äußert sich eine intrauterine Bestrahlung in 3 Hauptreaktionen: 1. prä- oder postimplantativer Tod, 2. morphologische Abnormitäten (Missbildungen), und 3. Wachstumsretardationen. Eine Strahlenexposition von Präimplantationsstadien bewirkt vornehmlich ein Absterben der betroffenen Individuen, während in der Fetogenese Wachstumsstörungen

zu den am häufigsten beobachteten Strahleneffekten gehören.

Die der Präimplantationsperiode folgende *Organbildungsphase* (Organogenese) zeichnet sich schliesslich durch eine maximale Sensibilität hinsichtlich strahleninduzierter Missbildungen aus (siehe Zusammenfassung von FRITZ-NIGGLI, 1972). Die Organogenese ist nicht nur die risikoreichste Entwicklungsphase in bezug auf teratogene und neoplastische Strahlenwirkungen, sondern unglücklicherweise auch die häufigste Expositionsperiode bei strahlendiagnostischen Untersuchungen an Schwangeren (MOSSMAN und HILL, 1982). Beim Menschen werden die verschiedenen Organe in einem Zeitraum von etwa 5 Wochen (2. bis 7. Woche p.c., BEIR 1980), bei der Maus innerhalb von 6 Tagen (Tag 7.5 - 12.5 p.c., RUGH 1968) angelegt. Als Hauptgrund für die ausgeprägte Strahlenempfindlichkeit der Organogenese nennt FRITZ-NIGGLI (1959) neben der durch Gestaltungsbewegungen bedingten hohen Mitoseaktivität vor allem die besonderen Differenzierungsleistungen von Embryonalzellen.

Mögliche Ursachen von strahlenbedingten Entwicklungsstörungen

Die Ursachen der makroskopisch feststellbaren Schädigungen des entstehenden Organismus sind auf der zellulären und subzellulären Ebene zu suchen. Mit den möglichen Auslösemechanismen von strahlenbedingten Embryopathien haben sich mehrere Autoren auseinandergesetzt (u.a. RUSSELL und RUSSELL, 1954; MURAKAMI, 1963; WEGNER, 1969; FRITZ-NIGGLI, 1972; WILSON, 1973; PIZZARELLO und WITCOFSKI, 1982; BECKMAN und BRENT, 1984). Das primäre Schädigungsmuster nach einem Strahleninsult ist recht breit und umfasst Effekte wie Zelltod, Mitoschemmung, Beeinträchtigung der interzellulären Kommunikation (Induktionsausfall, Koordinations- und Organisationsstörungen, Migrationsstörungen) und Veränderungen der Makromolekularstruktur (MICHEL, 1982; BRENT, 1984). Als besonders strahlenempfindlich werden die Chromosomen betrachtet (RUSSELL und RUSSELL, 1954; UNSCEAR, 1977; BECKMAN und BRENT, 1984). Die chromosomale Schädigung wird oft an den Anfang der strahlenbiologischen Wirkungskette gestellt und führt in den meisten Fällen zum Zelltod, der letztendlich als Ausgangspunkt für die Genese von Entwicklungsstörungen angesehen wird (WEGNER, 1969; FRAENZ, 1971; WILSON, 1973; SCOTT, 1977).

Weiterhin wurden biochemische Störungen (Hemmung der DNS-, mRNS-, rRNS- und Proteinsynthese), Membrandefekte und ultrastrukturelle Veränderungen der zytoplasmatischen Organellen gefunden (FRITZ-NIGGLI, 1975; UNSCEAR, 1977). Welche der aufgeführten Mechanismen für die Entstehung bestimmter embryopathogenen Formen ausschlaggebend sind, ist noch weitgehend unbekannt.

Es wurde bereits früher darauf hingewiesen (FRITZ-NIGGLI, 1972; WILSON, 1973) dass die Analyse der strahlenbedingten Störungen durch die Komplexität des Entwicklungsgeschehens ungemein erschwert wird. Der Embryo besteht aus einer Vielzahl sich teilender, differenzierender, interagierender und migrierender Zellpopulationen, die in ständig wechselnden Mustern angeordnet und sowohl zeitlich wie räumlich miteinander koordiniert sind. Insbesondere die zwei erstgenannten Vorgänge (hohe Proliferationsrate und Differenzierungszustand embryonaler Zellen) gelten als Hauptgründe dafür, dass sich früheste Anzeichen einer gestörten Normogenese meist in einer Verminderung zellulärer Reproduktions- oder/und Ueberlebensrate äussern (POSWILLO, 1976; SAXEN, 1976; PIZZARELLO und WITCOFSKI, 1982).

Erholungspotenzen bestrahlter Vorgeburtsstadien

Der hohen Strahlensensibilität des Embryo steht seine bemerkenswerte Erholungs- oder Reparatkapazität entgegen. Wiederholt wurde betont (RUGH, 1958; FRITZ-NIGGLI, 1972; BRENT, 1979; D'AMATO, 1982), dass die Art und das Ausmass der Strahlenreaktion durch das Reparaturvermögen des Keimes mitbestimmt wird. Begünstigt wird eine Erholung unter anderem durch proliferative Reparationsprozesse (ausgeprägt bei früheren Entwicklungsstadien mit hoher Zellteilungsrate), Milieufaktoren sowie durch das intrazelluläre Repairvermögen (FRITZ-NIGGLI, 1972). Ebenfalls spielt das Aktivierungsausmass *phagozytärer Reaktionen* (Eliminierung geschädigter Zellen durch Makrophagen oder intakte Nachbarzellen) nach einem Strahleninsult bei der Regeneration eines Organprimordiums oder des Embryo als Ganzes eine wichtige Rolle (RUGH und WOLFF, 1957).

Nach UNSCEAR 77 gehört die strahlenbedingte Schädigung von Erholungsmechanismen (z.B. Suppression des Auftretens von Phagozyten) zum Inventar embryopathogener Erscheinungsformen und sollte bei zytologischen Analysen dementsprechend mitberücksichtigt werden. Es ist auffallend, dass bei den zahlreichen Untersuchungen zellulärer Strahlenwirkungen während der Pränatalentwicklung der äusserst wichtige Vorgang der Phagozytose bisher höchstens in qualitativer Form behandelt worden ist. Dabei kann nur durch das zahlenmässige Erfassen phagozytärer Einheiten eine präzise Information hinsichtlich der Belastbarkeit verschiedener Embryonalgewebe durch Einwirkung externer Noxen gewonnen werden.

4. Untersuchungssystem: frühembryonale Augenanlage als biologischer Indikator von primären Schädigungsmechanismen und Erholungspotenzen

Es wurde schon früh darauf hingewiesen (GRUENWALD, 1947; HALL, 1953; TUCHMANN-DUPLESSIS, 1961), dass unter allen Organen die *Augen* und das Gehirn am empfindlichsten auf externe Agenzien reagieren. Störungen des ZNS und Augenmissbildungen stellen Haupteffekte der intra-uterinen Bestrahlungen beim Menschen dar (BRENT, 1980). Im Tierexperiment (Maus) beobachteten MICHEL und FRITZ-NIGGLI (1977) nach Röntgenbestrahlung mit der extrem niedrigen Dosis von 1 cGy während der Organogenese vorwiegend Augenanomalien, deren Häufigkeit um ein Vielfaches höher war als bei der Kontrolle.

Eine der Hauptursachen für die ausgeprägte Strahlensensibilität des primordialen Augengewebes ist dessen rasche und lang andauernde Proliferation (GLUECKSMANN, 1959). Schnell wachsende Blasteme sind bekanntlich viel störungsanfälliger auf äussere Einflüsse als langsam wachsende, insbesondere in der Zeitspanne von der Anlage bis zum Abschluss der Primitiventwicklung (GOERTTLER, 1964). Auch KRIEGEL und SHIBATA (1964) betrachten die Periode der Einstülpungs- und Umwachsungsprozesse im Zusammenhang mit der Augenbecherbildung (Maus: Tag 9-10) als besonders kritisch hinsichtlich teratogener Strahlenwirkungen. Zudem dauert die sensible Phase der Zelldifferenzierung über die Organogenese hinaus die *gesamte* Schwangerschaft an (STRANGE und MURPHREE, 1972).

Die differenzierenden Neuralzellen, die sogenannten *Neuroblasten*, nehmen eine Mittelstellung zwischen dem strahlenresistenten Neuroektoderm und definitiven Neuronen ein und gelten als die *strahlensensibelste* Zellform überhaupt (HICKS, 1952; RUGH, 1958; KALTER, 1968). Die Neuroblasten, die beim Menschen erstmals etwa am Tag 18 p.c. (Maus: Tag 7 p.c.) erscheinen und bis zur neonatalen Periode bestehen bleiben, repräsentieren gleichzeitig den invasivsten und meistverbreiteten embryonalen Zelltypus (RUGH, 1971). Alle diese Faktoren (hohe Vermehrungsrate, Differenzierungszustand und extreme Strahlenempfindlichkeit von Neuroblasten) machen das embryo-fetale Auge zum besonders gut geeigneten Objekt der Analyse von Wechselbeziehungen zwischen energiereichen Strahlen und anderen zytotoxischen Noxen.

Weitere Vorteile des Primordialauges als Modellsystem für Studien von Schädigungs- und Erlungsmechanismen des Embryonalgewebes ergeben sich auf grund dessen strukturellen Aufbaus:

— Das Auge ist ein zusammengesetztes Organ, bestehend aus einer Vielzahl miteinander interagierender Strukturen (Linse, Pigmentepithel, Retina etc), und dies innerhalb eines relativ

kleinen Gewebsvolumens (COHEN, 1961). Angesichts der geringen Grösse kann die *gesamte Anlage*, trotz ihrer Komplexität, als *Einheit* zur Auswertung gelangen.

- Am gleichen histologischen Schnitt können Reaktionen von Primordialgeweben verschiedenen Ursprungs (Oberflächenektoderm, Neuroektoderm, Mesoderm) auf eine bestimmte Behandlung hin untersucht werden (CHRISTENSEN, 1976).
- Die sich differenzierenden vielfältigen Augenstrukturen ermöglichen ein deutliches und *frühzeitiges* Erkennen von morphogenetischen Abweichungen (KRIEGEL und SHIBATA, 1964).
- Die Augen-Differenzierung verläuft in räumlich geordneten und zeitlich koordinierten Interaktionsschritten (COULOMBRE und COULOMBRE (1977). Die geringe Dauer solcher Interaktionen erhöht die Verletzlichkeit des primordialen Augengewebes auch gegenüber kurz-wirkenden Umweltagenzien (PADMANABHAN et al., 1981).
- Die Normalentwicklung der Augen bei der Maus ist sehr genau untersucht worden (COHEN, 1961; PEI und RHODIN, 1970; KAUFMAN, 1979) und stimmt (zeitliche Faktoren abgesehen) weitgehend mit jener des Menschen überein (HOAR, 1982). Dadurch wird die Aussagekraft tierexperimentell gewonnener Daten beträchtlich gesteigert.

Ueber die Strahlenempfindlichkeit sich entwickelnder Augen gibt es bereits ein recht umfassendes Schrifttum. Arbeiten, die sich mit histo-pathologischen Veränderungen, Zelltod, Proliferationshemmung und Erholung des präsumptiven Augengewebes der *Maus* (RUGH und WOLFF, 1955, 1957; MAJIMA, 1961, 1962; KRIEGEL und SHIBATA, 1964; MURAKAMI, 1965, 1968; SAKURAI, 1968; CHRISTENSEN, 1976; TAKEUCHI et al., 1977 a; SHIRAI, 1978 a,b; BALLA und Mitarb., 1981, 1982, 1983; SMALHEISER und CRAIN, 1984), der *Ratte* (GLUECKSMANN, 1959; TUCHMANN-DUPLESSIS und MERCIER-PAROT, 1961; HICKS und D'AMATO, 1963; STRANGE und MURPHREE, 1972), des *Affen* (RUGH, 1967; RUGH und SKAREDOFF, 1969; RUGH, 1973) und des *Menschen* (MANN, 1957; COULOMBRE und COULOMBRE, 1977) befassten, zeigten ausser der verschiedensten Schädigungsmuster auch ein bemerkenswertes Regenerationsvermögen dieses Organs. Speziell hervorgehoben wurde von RUGH und WOLFF (1955, 1957) die Strahlenempfindlichkeit der zukünftigen *Netzhaut* (Retina), die auf den besonders hohen Anteil an Neuroblasten zurückzuführen ist.

Dass die sich entwickelnden Augen auch äusserst sensibel auf verschiedene chemische

Substanzen wie Cyclophosphamid, Hypervitaminose A, Kortison, Concanavalin A, BrdU, Vincristin, Vinblastin, Actinomycin D usw. reagieren, haben experimentelle Studien an Nagetieren (WOOLLAM et al., 1959; TUCHMANN-DUPLESSIS und MERCIER-PAROT, 1961; FERM, 1964; SINGH und SANYAL, 1976; PADMANABHAN et al., 1981) und Hühnchen (MAYERSON und MOSCONA, 1979; MELLER, 1981) bewiesen.

Merkwürdigerweise sind trotz der Vorteile des embryo-fetalen Auges für Studien primärer Schädigungsmechanismen bis anhin keine genaueren quantitativen Angaben zu diesem wichtigen Thema vorhanden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere und Tierhaltung

Es wurden NMRI-Albinomäuse (aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, BRD) verwendet. Das Alter der Tiere betrug 2 1/2-3 Monate, das Körpergewicht lag durchschnittlich bei 32 Gramm. Verpaart wurden nur Weibchen mit einem Gewicht von mindestens 27 und maximal 37 g. Alle Tiere wurden unter standardisierten Umweltsbedingungen gehalten (relative Luftfeuchtigkeit 65 %, Temperatur $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden, wobei die künstliche Beleuchtung jeweils von 7.00 bis 19.00 Uhr eingeschaltet war).

2. Paarung und Konzeptionsbestimmung

Jeweils abends um 17 Uhr wurden 4 bis 5 virginelle Weibchen mit gleichaltrigen Männchen des gleichen Stammes über Nacht zusammengebracht. Am nächsten Morgen um 8 Uhr wurden die weiblichen Tiere auf das Vorhandensein eines sogenannten Vaginalpfropfes als ein Zeichen erfolgter Paarung hin untersucht. Bei positivem Befund wurden die betreffenden Tiere abge-sondert, gewogen und mit Methylenblau (Vitalfärbung) markiert. Der Tag, an dem der Kopulationspfropf nachgewiesen wurde, galt als "Tag 0" der Schwangerschaft.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass das Auftreten eines Vaginalpfropfes nicht unbedingt mit einer Befruchtung gleichzusetzen ist. Anbetracht der Tatsache, dass die Ovulation meist zwischen 24-3 Uhr stattfindet, kann bei einer Fertilitätsdauer der Spermien von lediglich 6 Stunden nach einer "verfrühten" Kopulation die Ei-Befruchtung ausbleiben (SAUERBIER, 1982). Da weder der Zeitpunkt der Ovulation noch derjenige des Eindringens einer Samenzelle in das Ei sicher bestimmt werden können, müsste das Alter der Embryone bereits am "Tag 0" in einem Bereiche zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden schwanken. Nach SCHNEIDER und NORTON (1979) können auch bei zeitlich äusserst begrenzten Paarungsbedingungen im Verlaufe der Gestationsperiode im gleichen Wurf Entwicklungsunterschiede von bis zu 20 Stunden festgestellt werden.

Am Behandlungstag wurden die tragenden Tiere nochmals gewogen und zwischen 8 und 9 Uhr den verschiedenen Behandlungen unterzogen (genaues Prozedere siehe im Abschnitt Versuchsanordnung), wobei die Zuteilung zu den verschiedenen Versuchsgruppen zufällig erfolgte.

3. Agenzien

3.1 Vindesin

Vindesin wurde unter dem Verkaufsnamen ELDISINE von der Firma ELLI LILLY GmbH, Giessen, zur Verfügung gestellt. Jede Verpackung beinhaltet zwei Injektionsflaschen, wobei die eine 5 mg Vindesinsulfat (in 30 mg Pulver, 1:1) und die zweite 5 ml Lösungsmittel (isotonische Natriumchlorid-Lösung mit 0.045ml Benzylalkohol als Konservierungsmittel) enthält. Um die richtige Konzentration des Chemikaliiums zu erhalten, wurde unter sterilen Bedingungen jeweils 6 mg Pulver (1 mg Vindesin) abgewogen und mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9 %) verdünnt. Die angebrochene Injektionsflasche wurde wasserdicht verschlossen (Parafilm "M") und im Kühlschrank innerhalb der angegebenen Haltungsfrist aufbewahrt. Die gelöste Substanz wurde maximal während 2 Wochen verwendet, wobei sicherheitshalber für den ersten Verdünnungsschritt immer die mit dem Konservierungsmittel versetzte Natriumchlorid-Lösung benützt wurde.

Je nach Körpergewicht erhielten die trächtigen Tiere ein Flüssigkeitsvolumen zwischen 0.6 und 1.0 ml. Den Kontrolltieren wurden äquivalente Volumina an physiologischer Kochsalzlösung verabreicht. Die Injektion von VDS oder Salzlösung erfolgte intraperitoneal mittels OMNIFIX-Tuberkulin 1 ml/100 Einheiten-Einmalspritzen und SSC STERIKAN-Einmalkanülen 0.5 x 17.

3.2. Röntgenstrahlen

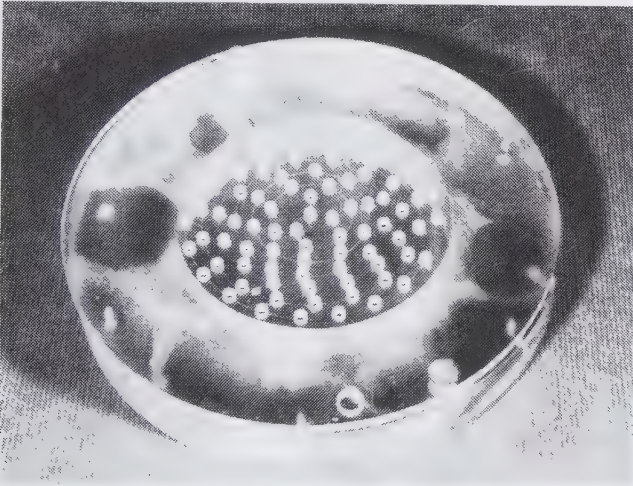
Die Bestrahlungsbedingungen waren folgende:

Bestrahlungsgerät:	240 kVp Röntgentherapie-Gerät (Firma Picker)
Röhrenspannung:	200 kVp
Röhrenstrom:	12 mA
Filter:	1.0 mm Aluminium + 0.5 mm Kupfer
Erste Halbwertschicht:	0.93 mm Kupfer
Fokus-Objekt-Abstand:	50 cm
Dosisleistung am Embryo:	30.5 cGy pro Minute
Expositionszeit:	2 Minuten 57 Sekunden

Die Gesamtkörperdosis, welche an die Muttertiere abgegeben wurde, betrug 0.9 Gy.

Die trächtigen Versuchstiere wurden zur Applikation einer einmaligen Ganzkörperbestrahlung zu je 5 in einem runden, mit Atemlöchern versehenem Plexiglasbehälter (dem sog. Bestrahlungsphantom) eingesperrt. Der Behälter hatte eine Innenhöhe von 3 cm und einen Durchmesser von 11 cm, so dass sich die Tiere in einem homogenen Bestrahlungsfeld befanden (siehe Abbildung 1).

Abb. 1: Das Bestrahlungsphantom



Da das Einsperren in ein enges Bestrahlungsphantom für die Weibchen eine Stresssituation bedeutet, welche zu einer zusätzlichen Belastung des vorgeburtlichen Organismus führen kann (MICHEL und FRITZ-NIGGLI, 1978), wurden die Kontrolltiere einer "Scheinbestrahlung" (d.h. Einsperren für die Dauer der Expositionszeit) unterzogen. Um die Möglichkeit eines sog. "Käfig-Effektes" prüfen zu können, wurden in einem Vorversuch die Nachkommen der scheinbestrahlten Muttertiere mit denjenigen von nicht-eingesperrten Weibchen verglichen. Obwohl die makroskopische Untersuchung der Mausfeten am Tag 18 der Gestation keine Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen ergab, wurden als Vergleichswerte zu den nach Applikation von Vindesin oder Strahlung ermittelten Daten die Ergebnisse der Scheinbestrahlung beigezogen.

4. Die makroskopische Analyse

4.1 Versuchsanordnung

Die Behandlung der Muttertiere wurde am Tag 8 oder 9 der Schwangerschaft durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Mausembryonen in der auf äussere Einwirkungen höchst empfindlich reagierenden Organbildungsphase. Die intraperitoneale Injektion des Chemikaliums oder der NaCl-Lösung erfolgte jeweils *eine Stunde* vor Strahlenexposition oder Scheinbestrahlung, und zwar immer morgens um 8.00 Uhr. Dem Behandlungsmodus nach wurden die trächtigen Tiere am Tag 8 oder 9 der Gestation in je 10 verschiedene Versuchsgruppen aufgeteilt:

1. Gruppe: Kontrolle. Aequivalente Menge an physiologischer Kochsalzlösung und eingesperrt im Bestrahlungsphantom (Scheinbestrahlung).
2. Gruppe: 0.25 mg/kg VDS und Scheinbestrahlung.
3. Gruppe: 0.35 mg/kg VDS und Scheinbestrahlung.
4. Gruppe: 0.50 mg/kg VDS und Scheinbestrahlung.
5. Gruppe: 1.00 mg/kg VDS und Scheinbestrahlung.
6. Gruppe: Aequivalente Menge an NaCl und 0.9 Gy Röntgenstrahlen.
7. Gruppe: 0.25 mg/kg VDS + 0.9 Gy Röntgenstrahlen.
8. Gruppe: 0.35 mg/kg VDS + 0.9 Gy Röntgenstrahlen.
9. Gruppe: 0.50 mg/kg VDS + 0.9 Gy Röntgenstrahlen.
10. Gruppe: 1.00 mg/kg VDS + 0.9 Gy Röntgenstrahlen.

4.2 Auswertung

Die ersten Auswertungen am Tag 18 der Gestation können gewissermassen "in situ" vorgenommen werden. Nachdem die trächtigen Weibchen durch zervikale Dislokation getötet worden sind, wurden die beiden Uteri freigelegt, der Länge nach aufgeschnitten und die *Anzahl Implantationen* pro linkes und rechtes Uterushorn notiert. Ebenso wurden die *frühtoten* (d.h. resorbierten oder partiell mazerierten) und *spättoten* (d.h. erst kurz vor dem Examinationszeitpunkt abgestorbenen) Implantate registriert und ihre genaue Position aufgezeichnet. Anschliessend wurden die lebenden Feten in Chloroform abgetötet und einzeln gewogen. In Anbetracht der geschlechtsspezifischen Gewichtsunterschiede wurden die Werte für weibliche und männliche Tiere getrennt aufgetragen. Die 2 Standardabweichungen unter dem

Kontrollmittelwert liegenden Tiere wurden dann definitionsgemäss als *wachstumsretardiert* bezeichnet.

Nachdem die Feten während mindestens 14 Tage in Bouin-Lösung fixiert worden sind, wurden sie unter dem Stereomikroskop (Olympus-VT-II, Vergrösserung 20 x) eingehend auf etwaige Dysmorphien hin untersucht. Rein äusserlich können Himbruch, Exophthalmie, Mikrotie, Hypognathie, Hämorrhagien oder Extremitätenanomalien gut erkannt werden, während Hydro- oder Mikrozephalie, Augenreduktion, Gaumenspalten oder Nieren-Hypoplasien nur durch eine interne Analyse der betreffenden Organe nachweisbar sind. Zu diesem Zweck bedienten wir uns der von WILSON (1965) entwickelten Rasierklingschnitt-Technik. Die erste Schnittführung erfolgte transversal durch die Mund- und Ohrenregion des Fetus. Auf diese Weise kann nach Entfernen der dorsalen Zungenpartie das Palatinum freigelegt und auf das Vorhandensein eines Gaumenspaltes (Wolfsrachen) hin untersucht werden. Im Folgenden wurden weitere 3 Frontalschnitte durchgeführt, und zwar: a) durch die Nasenregion, um die Nasenhöhlen (Fusionsmöglichkeit) zu untersuchen, b) durch die Augen, um deren Grösse, Strukturaufbau und Orientierung zu bestimmen, und c) durch das Gehirn an der Stelle des grössten Durchmessers des Kopfes. Unter dem Binokular kann dann eine Gehirnverkleinerung (Mikrozephalie) oder eine durch vermehrte Ansammlung zerebrospinaler Flüssigkeit bedingte Erweiterung der beiden Lateralventrikel und des Zentralkanals (Hydrozephalus internus) gut nachgewiesen werden. Mit einem letzten Schnitt wurde der Rumpf etwa in der Mitte durchgetrennt, und zwar von der ventralen Seite her leicht schräg nach oben. Dannach wurden die Nieren freigelegt, ausgemessen und auf Defekte wie Hypoplasie, Aplasie oder Nierenfusion hin untersucht.

Die Auswertung der Parallelschnitte durch die Augenregion wurde mittels eines Okulars mit eingebauter Messskala vorgenommen, wobei der grösste Augendurchmesser (äusserste Retina-Abgrenzung) sowie der Linsendurchmesser bestimmt worden sind. Als Mikrophthalmie wurden nur jene Augen bezeichnet, deren Durchmesser mindestens 2 Standardabweichungen unter dem Kontrollmittelwert lag. Bei der Anophthalmie handelt es sich in unseren Untersuchungen stets um jene Fälle, die sich durch ein *völliges* Fehlen von Augenstrukturen (also auch keine Augenrudimente vorhanden) auszeichneten.

Für die Bestimmung der Embryotoxizität am Tag 18 der Gestation wurden 3 Hauptparameter verwendet: Postimplantationstod, Wachstumsretardation und Missbildungen. In bezug auf die Implantationsrate und das Fetalgewicht wurden der Mittelwert ($\bar{x}$) und der mittlere Fehler ($s_{\bar{x}}$) berechnet, während für die restlichen Kriterien der jeweilige Anteil an geschädigten

Nachkommen bezogen auf das Total erhaltener Implantate oder Lebenden bestimmt worden ist.

Damit die Wechselbeziehungen zwischen Vindesin und Röntgenstrahlen quantifiziert werden können, haben wir uns für den von *ROTHMAN* (1974) aufgestellten Synergismus- oder Interaktionsindex *S* entschieden. Unter der Annahme, dass die Präsenz einer Noxe die Wirkung einer anderen nicht beeinflusst, wird ein Verhältnis zwischen der beobachteten Kombinationswirkung der beiden Agenzien ($P_{\text{beob.}}$) und der erwarteten Additivität ($P_{\text{erw.}}$, Summe der Einzelwirkungen beider Agenzien) gebildet. Je nach dem, ob der erhaltene Quotient ($P_{\text{beob.}}/P_{\text{erw.}}$) oder Interaktionsindex *S* gleich, grösser oder kleiner als 1 ist, spricht man von Additivität, Synergismus oder Antagonismus (siehe auch Tabelle 10).

Zu vermerken ist, dass nur Würfe mit mindestens 6 Implantationen ausgewertet worden sind. Insgesamt wurden 2388 lebende Feten aus total 270 Würfen unter der Stereolupe auf pathologische Erscheinungsformen hin untersucht.

4.3 Statistik

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen hinsichtlich prozentualer Häufigkeiten der verschiedenen Kriterien sind statistisch mittels eines der stärksten nicht-parametrischen Tests, des MANN-WHITNEY-U-Tests, geprüft worden (SIEGEL, 1976). Die ermittelten U-Werte wurden mit den kritischen bei Signifikanzebenen von 0.002, 0.02 und 0.05 für einen zweiseitigen Test verglichen. Obwohl in den Tabellen übersichtlicher Weise nur die signifikanten Unterschiede zwischen VDS oder Strahlung allein und Kontrolle, sowie jene zwischen der bestrahlten Gruppe und Kombinationsbehandlungen aufgeführt sind, wurden, falls biologisch sinnvoll, auch andere Gruppen gegeneinander getestet (z.B. VDS allein - VDS + Strahlung oder unterschiedliche Auswirkungen des gleichen Behandlungsmodus an beiden Gestationstagen).

Das Geschlechtsverhältnis bei wachstumsretardierten oder missgebildeten Feten wurde mittels des Vierfelder- χ^2 -Tests auf dem 5 %-Niveau geprüft. Bei den sogenannten schwach besetzten Vierfeldertafeln (d.h. $20 > n \geq 10$ und mindestens eine Erwartungshäufigkeit ≤ 3) wurde der exakte Test von Fischer angewandt (SACHS, 1970).

5. Die histologische Analyse der Augenanlagen

5.1 Versuchsanordnung

Als Behandlungszeitpunkt für die histologische Analyse der Augenanlagen wurde Tag 9 der Gestation gewählt, dies aus folgenden Gründen:

1. Am Tag 9 der Gestation befinden sich die entstehenden Augen in bezug auf ihre Strahlensensibilität in einer besonders kritischen Entwicklungsphase (KRIEGEL und SHIBATA, 1964).
2. Damit auch frühe Veränderungen auf zellulärer Ebene (Initialschäden) registriert werden können, sollte das Intervall zwischen Behandlung und Untersuchung 24 Stunden nicht überschreiten. Eine Reproduzierbarkeit der an einem Embryonalorgan gewonnenen Daten wird jedoch nur dann gewährleistet, falls dieses unter *standardisierten* Bedingungen für die mikroskopische Analyse verarbeitet werden kann. Nun können die Mausembryonen vor dem neunten Entwicklungstag wegen ihrer geringen Grösse nur zusammen mit den Embryonalhüllen verletzungsfrei aus dem Uterus entfernt werden, wodurch beim Anfertigen von histologischen Präparaten die Schnittrichtung durch eine bestimmte Region weitgehend dem Zufall überlassen wird. Am Tag 9 nach Befruchtung können jedoch die Implantate (Durchschnittsgrösse 2 mm) bei genügender Uebung bereits kurz nach Behandlung aus den Fruchthüllen befreit, fixiert und zum Schneiden in die richtige Position gebracht werden.
3. Die frühen Augenanlagen zeichnen sich durch einen relativ einfachen histologischen Aufbau und eine klare Abgrenzbarkeit der einzelnen Augenstrukturen aus. Dadurch wird eine verlässlichere Datenerhebung und bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen ermöglicht. Bei komplizierter strukturierten Embryonalorganen (wie z.B. dem Gehirn) kann meist nur ein kleiner Abschnitt ausgewertet werden. In den vorliegenden Untersuchungen hingegen liessen sich die *ganzen* Primordien auf qualitative und quantitative Zellveränderungen hin studieren.

Des äusserst zeitbeanspruchenden präparativen Aufwandes wegen konnten nur je eine Dosierung von Vindesin (0.35 mg/kg) und von Röntgenstrahlen (0.9 Gy) auf ihre zellschädigende Wirkung hin getestet werden. Diese Konzentration des Zytostatikums wurde gewählt, da die Vorbehandlung mit 0.35 mg/kg VDS am Tag 8 der Gestation (makroskopische Studie) eine besonders

markante Potenzierung der Strahlenreaktion ergab. Damit stellte sich die Frage, ob nicht auch am Tag 9 zumindest auf der zellulären Ebene eine ähnliche Interaktion zwischen den beiden Agenzien stattfinden könnte.

Ansonsten entspricht die Versuchsanordnung jener für die makroskopische Analyse, ebenso gleichen sich die Bestrahlungsbedingungen und die Verabreichungsform des Chemikalioms. Die Entnahme der Embryone für Untersuchungszwecke erfolgte jeweils 4, 12 und 24 Stunden nach Behandlung.

5.2 Herstellung von Präparaten

Sofort nach der Entnahme aus dem Uterus wurden die Embryonen samt Fruchthüllen im Bouin fixiert und unter dem Binokular vorsichtig herauspräpariert. Nach einer Fixationszeit von mindestens 2 Wochen wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und über Butanol als Zwischenstufe im flüssigen Paraplast bei 60⁰ C aufbewahrt. Zum Einbetten wurden pro Versuchsgruppe bis zu 17 Embryonen aus 4-6 verschiedenen Würfen in Petrischalen mit heissem Paraplast transferiert und die Köpfe unter dem Stercomikroskop einzeln eingebettet. In diesem Zusammenhang ist zu vermerken, dass nur morphologisch *vergleichbare* Entwicklungsstadien für die histologische Analyse beigezogen worden sind. Bei der Beurteilung, ob sich die Implantate in einem dem jeweiligen Untersuchungsintervall entsprechenden Entwicklungszustand befanden, richteten wir uns nach den von RUGH (1968) gemachten Angaben.

Die eingebetteten Köpfe wurden so positioniert, dass bei einer frontalen Schnittebene die beiden Augenanlagen vollständig in 4.5 µm dicke Serienpräparate zerlegt werden konnten. Diese Schnittdicke entspricht etwa der Kerngrösse der untersuchten Zellen (Neuroblasten). Dadurch können bei der Auswertung die durch Ueberlagerung mehrerer Kernschichten bedingten Ungenauigkeiten vermieden werden. Die histologischen Schnitte wurden anschliessend mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

5.3 Auswertung

5.3.1 Charakteristika der untersuchten Augenanlagen und Auswertungszonen

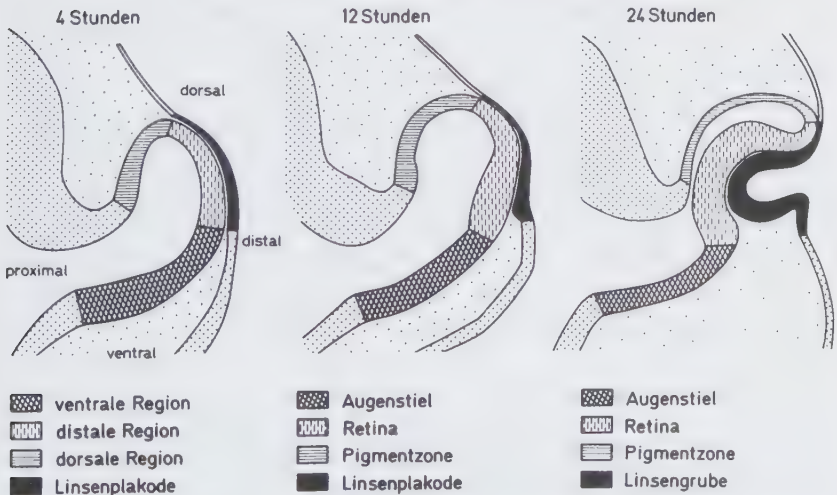
Die Abbildung 2 zeigt die charakteristischen Erscheinungsformen der Augenprimordien während der drei Untersuchungsintervalle. Nur Anlagen, die sich in einem mit der Zeichnung übereinstimmenden Entwicklungsstadium befanden, gelangten zur Auswertung. Dabei erfolgte die

Evaluation der diversen Untersuchungsparameter nicht nur am Primordium als Ganzes, sondern es wurde auch berücksichtigt, dass sich die prospektiven Augen aus morphologisch und funktionell verschiedenen Einzelstrukturen zusammensetzen.

Prinzipiell können lichtmikroskopisch auf grund der Orientierung und des histologischen Aufbaus 4 verschiedene Augenregionen unterschieden werden. Im ventralen Teil kommunizieren die Anlagen via *Augenstiel* mit dem Gehirn, im distalen Bereich differenzieren sich die zukünftige *Netzhaut* (Retina) und die *Linse*, und im dorsalen Abschnitt entsteht das präsumptive *Pigmentepithel*. Durch die Unterteilung des Gesamtprimordiums in die erwähnten Auswertungsregionen können auch subtile Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Augenstrukturen aufgedeckt werden.

Abb. 2

Auswertungsbereiche in den Augenanlagen der Maus 4, 12 und 24 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Entwicklung



Pro Augenanlage (total 20 Augenprimordien pro Versuchsgruppe) wurden jeweils 6 Einzelschnitte aus dem Bereiche des durchgehenden Augenlumens ausgewertet.

Die zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung untersuchten Augenstadien, sowie die Auswertungsbereiche innerhalb derselben lassen sich folgendermassen charakterisieren:

- 4 Stunden nach Behandlung (d.h. am Tag 9 plus 4 Stunden) präsentieren sich die Embryonalanlagen als die sogenannten primären Augenblasen, die als bilaterale Ausstülpungen des Vorderhirn-Neuroektoderms entstehen (HOAR, 1982). Die einzelnen Augenstrukturen sind noch wenig differenziert, so dass deren Abgrenzung mehr oder weniger willkürlich erfolgte. Da die Linse als ein von der angehenden Netzhaut induziertes Gebilde mit jener im engen Kontakt steht, wurde die Ausdehnung der Retina (distale Region) durch die kleinste Distanz zum Linsenepithel (Linsenplakode) markiert. Im unteren Blasenabschnitt schliesst sich zum Prosenzephalon hin die sog. ventrale Zone (Augenstiel) und im oberen die dorsale Region (Pigmentzone) an.
- 12 Stunden nach Behandlung (Tag 9 1/2) zeichnet sich eine allmähliche Verdickung der Retina im disto-ventralen Blasenabschnitt ab. Das darüberliegende Kopfektoderm (Linsenplakode) wird ebenfalls mächtiger und beginnt sich zudem am ventralen Pol einzustülpen. Da sich zum gegebenen Zeitpunkt die einzelnen Augenstrukturen bereits recht gut voneinander abgrenzen lassen, wurden für die Auswertungsbereiche erstmals *funktionelle* Bezeichnungen (Augenstiel, Retina, Pigmentzone) eingeführt.
- 24 Stunden nach Behandlung (Tag 10 der Gestation) erfolgt eine simultane Invagination der Linsenplakode und der Präsumptiven Retina zum Linsen- und Augenbecher (SILVER und HUGHES, 1973). Dieses auch als sekundäre Augenblase bezeichnete Stadium wird weiterhin dadurch gekennzeichnet, indem die Retina durch deren Einstülpung zu einem zweischichtigen Gebilde wird. Die innere, intensiv proliferierende Schicht wird zum neuralen Teil der Netzhaut, während das äussere, relativ inaktive Blatt das zukünftige Pigmentepithel der Retina darstellt (PEI und RHODIN, 1970).

5.3.2 Untersuchungskriterien

Die zytotoxische Wirksamkeit der applizierten Agenzien auf das gesamte Primordium sowie auf die einzelnen Augenregionen wurde anhand folgender Kriterien geprüft:

I. Mitoseaktivität.

In jedem Schnittpräparat wurde bei gleicher Vergrösserung die Zahl der Prophasen, Metaphasen, Anaphasen und Telophasen bestimmt. Die Ana- und Telophasen wurden als

Spätmitosen bei der Häufigkeitsberechnung zusammengefasst (RHODIER et al., 1984), während die *Frühmitosen* (Prophasen) und Metaphasen einzeln gezählt worden sind. Errechnet wurden die durchschnittlichen Anteile der drei Teilungsfiguren sowie die Gesamtzahl von Mitosen pro Schnittbild.

II. Verteilungsmuster der einzelnen Mitosestadien

Es wurden die prozentualen Anteile von Prophasen, Metaphasen und Ana/Telophasen am Total gezählter Mitosen bestimmt. Dieses Kriterium wurde eingeführt, da das relative Verteilungsmuster mit der Kontrollgruppe übereinstimmen kann, auch wenn die absoluten Inzidenzen der untersuchten Teilungsstadien durch eine Behandlung herabgesetzt sind. Die Verschiebungen des Prozentualverhältnisses einzelner Mitosephasen stellen einen wichtigen Hinweis betreffend induzierter Zellzyklusveränderungen dar.

III. Zelltod

Als tot wurden im Lichtmikroskop jene Zellen betrachtet, die Merkmale der verschiedenen Degenerationsstufen aufwiesen. Dazu gehören unter anderem Chromatinkondensation, Kernschrumpfung, Abrundung der Kern- und Zellform (Karyo- bzw. Zellpyknose), Zunahme der Elektronendichte des Zytoplasma sowie zellulärer Zerfall in kleine bis kleinste Fragmente (GARCIA-PORRERO und OJEDA, 1978; YOUNG, 1984). Alle diese Erscheinungsformen sind in der vorliegenden Studie unter dem Begriff Nekrose oder Pyknose zusammengefasst. Ausgezählt wurden *alle* demassen betroffenen Zellen, wobei sehr eng nebeneinander liegende Mikrofragmente (3 bis 4) jeweils als Ueberreste einer einzigen Zelle angesehen wurden. Zu vermerken ist, dass nicht nur "freie" Nekrosen, sondern auch solche innerhalb von Phagozyten bei der Quantifizierung der Zellletalität mitgezählt worden sind.

Aehnlich wie bei der Mitoseaktivität wurden die durchschnittliche Nekrosezahl und der mittlere Fehler pro Schnitt berechnet.

Da der Mittelwert allein nur beschränkt das Zerstörungsausmass einer bestimmten Augenpartie beschreibt, wurden die gezählten Pyknosen willkürlich in 4 verschiedene Schädigungskategorien eingeteilt. Auf grund der unterschiedlichen Ausdehnung und Gewebmasse der einzelnen Evaluationszonen, sowie deren Gestaltsveränderungen im Verlaufe der Untersuchungsperiode wurde die für ein bestimmtes Schädigungsausmass benötigte Degenerationszahl dem jeweiligen morphogenetischen Zustand angepasst (vergleiche Tabellen 21, 24 und 27). Bestimmt wurde der Prozentsatz an Schnittpräparaten

mit sporadischer, mässiger, extensiver und massiver Nekrotisierung des embryonalen Gewebes.

IV. *Phagozytose*

Damit sich das embryonale Gewebe von abgestorbenen Zellen befreien kann, treten an verschiedenen Stellen der Anlage die Phagozyten oder Makrophagen in Aktion. Sie werden im Lichtmikroskop als helle, ruhende oder mitotisch aktive Zellen mit einer bis mehreren Degenerationsgranulen in ihrem Innern erkannt. In jedem Schnitt wurde die Zahl der Eliminationszellen in den einzelnen Augenstrukturen sowie gesamthaft bestimmt. Errechnet wurde, wie bei den Kriterien Zellteilung und Zelltod, die mittlere Häufigkeit von Makrophagen pro Schnittregion. Zu erwähnen ist, dass beim Auszählen phagozytärer Elemente auch die Anzahl einverleibter Zellüberreste registriert worden ist. Dadurch erhält man zusätzliche Informationen hinsichtlich der Regenerationskapazität des involvierten Gewebes.

Die lichtmikroskopische Analyse der Serienpräparate erfolgte bei 500-facher Vergrösserung. Pro Versuchsgruppe wurden mindestens 120 Schnittbilder auf die oben aufgeführten Kriterien hin untersucht. Die in den verschiedenen Tabellen aufgelisteten Daten wurden an insgesamt 251 Augenprimordien und 1506 Einzelschnitten ermittelt.

5.4 Statistik

Wie bei der makroskopischen Studie wurden auch die durch histologische Analyse erhaltenen Häufigkeitswerte anhand des MANN-WHITNEY-U-Tests auf ihre Signifikanz hin geprüft. Im Vordergrund stand die Frage, ob die Vorgänge der Zellvermehrung und des Zelluntergangs, sowie jene der Phagozytose und Nekrose in einer bestimmten Beziehung zueinander stehen. Um dies zu prüfen, wurde eine *Korrelationsanalyse* der erwähnten Kriterien durchgeführt. Der berechnete *Korrelationskoeffizient* r bewegt sich in einem Bereiche zwischen 1 und -1. Bei einem *positiven* r nehmen zwei Merkmale in ihrer Häufigkeit gleichsinnig zu oder ab, bei einem *negativen* erhöht sich die Inzidenz des einen Kriteriums auf Kosten des anderen (ungleichsinnige Korrelation). Die untersuchten Merkmale sind umso stärker miteinander korreliert, je näher der Korrelationskoeffizient bei 1 (-1) liegt. Bei $r=1$ (-1) besteht dann ein funktionaler Zusammenhang zwischen den beiden Untersuchungskriterien (SACHS, 1970).

III. RESULTATE

1. Die makroskopische Analyse

1.1 Behandlung am Tag 9 der Gestation

Da als gemeinsamer Behandlungszeitpunkt für die makroskopische und zytologische Studie der Tag 9 der Gestation gewählt wurde (die Versuche am Tag 8 wurden zwecks Informationserweiterung zu der grob-morphologischen Analyse erst nachträglich durchgeführt), werden zuerst die am späteren Entwicklungsstadium ermittelten Ergebnisse besprochen.

1.1.1 Mortalität

Bevor auf die eigentlichen Befunde eingegangen wird, sollten an dieser Stelle noch einige Bemerkungen zur quantitativen Datenauswertung vorangestellt werden. Die tabellarisch zusammengefassten Ergebnisse der makroskopischen Analyse drücken den jeweiligen Anteil an geschädigten Tieren bezogen auf die *Gesamtzahl* vorhandener Implantate aus. Die in den einzelnen Würfen auftretende Variabilität bezüglich der Häufigkeit eines bestimmten Toxizitätsmerkmals kommt somit nicht zum Ausdruck. Bedingt durch die Inhomogenität des Konzeptionszeitpunkts können sich die Geschwister eines Wurfes jedoch in einer empfindlicheren Entwicklungsphase befinden als andere und deswegen auf eine Behandlung in einer verstärkten Form reagieren. Um die Schädigungspotenz einer Substanz oder der abgegebenen Strahlendosis richtig beurteilen zu können, sollte somit neben den Anteil betroffener Feten an der Gesamtpopulation auch das Reaktionsausmass einzelner Würfe mitberücksichtigt werden. So mag, gesamthaft betrachtet, bei hinreichender Stichprobengrösse eine Behandlung anscheinend kaum negative Auswirkungen haben, einzelne Würfe hingegen können dennoch hohe Schädigungsraten aufweisen. Gerade solche Fälle spielen bei Risikoschätzungen eine wichtige Rolle, da sie die Gefährlichkeit einer Exposition empfindlicher Entwicklungsstadien aufdecken. In den folgenden Abschnitten sollen die Schädigungsfrequenzen pro Einzelwurf insbesondere dann erwähnt werden, falls sie von Wurf zu Wurf grossen Schwankungen unterworfen sind.

Kontrolle.

Bei der Kontrollgruppe betrug der Anteil an abgestorbenen Implantaten 10.8 % (Tabelle 1). Konkret bedeutet diese Zahl, dass pro Wurf (im Durchschnitt 13.5 Implantate) nie mehr als 3 Resorptionen auftraten.

Applikation von Vindesin allein.

Die Abgabe der niedrigsten Vindesin-Konzentration, nämlich 0.25 mg/kg, bedingte noch keine signifikante Zunahme intrauteriner Todesfälle. Bei zwei Würfen wurden immerhin 1/3 der Implantate abgetötet und in einem Wurf sogar 6 von 15 Feten (40 %) letal geschädigt. Somit machen sich bereits bei tiefster Dosierung des Alkaloids erste Anzeichen für dessen Toxizität bemerkbar. Die Verabreichung von 0.35 mg/kg Vindesin (VDS) verdoppelte die spontane Mortalitätsrate von 10.8 auf 22.8 %. Diese Steigerung geht in erster Linie auf Implantationsverluste von über 70 % bei zwei Würfen, die sich zum Behandlungszeitpunkt offensichtlich in einem besonders sensiblen Entwicklungsstadium befanden, zurück. Die Erhöhung der Dosis um nur 0.15 mg/kg bewirkte einen sprunghaften Anstieg der Sterbefrequenz auf mehr als das Dreifache des Effektes der nächsttieferen Konzentration. Mit 76.4 % ist die Resorptionshäufigkeit in der 0.5 mg/kg-Gruppe um einen Faktor von 7 höher als bei der Kontrolle ($p < 0.002$). Diese Befunde zeigen, dass der Schwellenwert hinsichtlich einer letalen Schädigung durch das Zytostatikum im Bereich zwischen 0.35 und 0.5 mg/kg liegen muss. Die hohe Toxizität der zuletzt genannten Dosierung kann auch dadurch veranschaulicht werden, dass von insgesamt 13 untersuchten Würfen bei 5 alle Implantate, bei einem Wurf 93 % und bei 4 Würfen über 70 % der Nachkommen resorbiert waren. Die Konzentration von 1.0 mg/kg Vindesin erwies sich schliesslich als Dosis letalis 100, nach deren Verabreichung gab es keine Ueberlebenden mehr.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Die Exposition schwangerer Mäuse mit 0.9 Gy Röntgenstrahlen erhöhte nicht die spontane Todesrate. Die Frequenz letaler Fälle betrug 9.2 % und lag somit sogar unterhalb der Kontrollebene. Was die einzelnen Würfe anbelangt, so wurden bei durchschnittlich 12.7 Implantationen maximal 3 Todesfälle pro Wurf registriert, die Verhältnisse entsprechen somit denjenigen der unbestrahlten Referenzgruppe.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Wie die graphische Darstellung des Vergleichs der Mortalitätsraten nach Applikation von VDS allein oder zusammen mit ionisierenden Strahlen (Abbildung 3) verdeutlicht, weist die Dosis-Effekt-Kurve für Kombinationsbehandlung einen ähnlichen Verlauf wie diejenige für Einzelanwendung der Substanz auf. Bis zur Dosierung von 0.35 mg/kg VDS plus Röntgenstrahlen ist die Todesrate nur im Bereiche einiger Prozente höher als nach alleiniger Bestrahlung, steigt

jedoch massiv in die Höhe nach Vorbehandlung mit 0.5 mg/kg VDS und erreicht einen Maximalwert von 100 % Letalität nach Kombination von 1.0 mg/kg VDS + 0.9 Gy. Auffallend beim Vergleich der beiden Kurven ist jedoch, dass, mit Ausnahme der höchsten Vindesin-Konzentration, alle Werte *tiefer* liegen als nach einfacher Zugabe von VDS.

Werden die in Tabelle 1 angegebenen prozentualen Mortalitätsanteile nach Verabreichung von VDS allein mit jenen nach Kombinationsbehandlung verglichen, so wird ersichtlich, dass durch die Bestrahlung der mit 0.35 und 0.5 mg/kg VDS injizierten Tiere die Zahl postimplantativer Todesfälle um 9.4 bzw. 16 % erniedrigt worden ist. In diesen beiden Kombinationsgruppen ergab sich die Tendenz zur strahlenbedingten Herabsetzung der Embryotoxizität von Vindesin bereits bei Ansicht der Einzelwürfe. So bewirkte die Vorbehandlung mit 0.35 mg/kg VDS nur bei einem von 13 Würfen eine Mortalitätsrate von mehr als 50 % und diejenige mit 0.5 mg/kg VDS verursachte ebenfalls nur in einem von 15 Würfen das Absterben sämtlicher Implantate (Einzeldosis von VDS: 5 von 13 Würfen !).

Die in Tabelle 10 aufgeführten Interaktionsindizes hinsichtlich des Kriteriums Mortalität zeigen, dass diese allesamt kleiner sind als 1, somit auf einen *antagonistischen Reaktionsmodus* zwischen Vindesin und Röntgenstrahlen hinweisen. Da die ionisierenden Strahlen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen keine Mortalitätswirkung ausübten, kann definitionsgemäss sogar ein, wenn auch nur partieller, *Schutzeffekt* der Röntgenstrahlen vor der embryo-letalen Wirkung des Antimitotikums postuliert werden.

Abschliessend zum Thema Mortalität nach Behandlung am Tag 9 sei vermerkt, dass die verwendeten Noxen, unabhängig davon, ob diese einzeln oder kombiniert verabreicht werden, ihre tödliche Wirkung bereits kurze Zeit nach Abgabe entfalten müssen. Stets dominierte der Frühtod (Resorption), d.h. die Embryonen starben noch vor Erreichen der Fetalphase.

1.1.2 Abnormalität

Unter den Begriff "abnorm" fallen in unserer Studie alle Feten, die zum Untersuchungszeitpunkt Zeichen der Missbildung oder/und Wachstumsretardation aufwiesen. Entwicklungsgestörte, jedoch abgestorbene Implantate wurden nur für die Mortalitätsberechnungen beigezogen.

Tabelle 2 vermittelt die Prozentualhäufigkeiten von Feten, die strukturell und gewichtsmässig nicht mit dem Normalbild übereinstimmen.

Kontrolle.

Bei der Kontrollgruppe war die Abnormitätsfrequenz mit 9,4 % etwa gleich hoch wie die Sterblichkeitsrate. Von insgesamt 15 ausgewerteten Würfen wiesen deren 6 überhaupt keine Entwicklungsstörungen auf und bei weiteren 4 lag die Schädigungsrate unterhalb der 10 %-Grenze. Lediglich 2 Würfe zeichneten sich durch einen Abnormitätsanteil von 30 % aus.

Applikation von Vindesin allein.

Nach Injektion von 0,25 mg/kg Vindesin entsprachen die Verhältnisse denjenigen der unbehandelten Gruppe. Nichtsdestoweniger waren bei einem Wurf 6 von 9 Implantaten (67 %) missgebildet oder retardiert, ein erstes Zeichen beginnender Toxizität der Substanz.

Anders als für die Letalität erfolgte ein signifikanter Anstieg der Abnormitätsrate bereits nach Verabreichung von 0,35 mg/kg VDS. Mit 26,2 % betrug der Anteil an entwicklungsgestörten Feten das 2,8-fache des Kontrollwertes. Massgeblich beteiligt an dieser Zunahme dürften 2 Würfe sein, bei denen 79 resp. 100 % Schädigungsanteil vorgefunden worden ist.

Von den 43 überlebenden Feten nach Zugabe von 0,5 mg/kg VDS wiesen deren 14 (32,6 %) pathomorphologische Veränderungen auf. Mit Ausnahme von Nachkommen zweier Würfe, die sich zum Behandlungszeitpunkt offensichtlich in einer wenig sensiblen Phase befanden und unbeschädigt blieben, zeichneten sich die wenigen Überlebenden (1 bis 5 Tiere pro Wurf) meist durch Entwicklungsstörungen aus.

Bestrahlung mit 0,9 Gy.

Die Applikation von 0,9 Gy am Tag 9 der Gestation scheint weder teratogene noch wachstumshemmende Effekte zu bewirken. Auch bezüglich der Schädigungsrate einzelner Würfe wurde das für die Kontrollgruppe erwähnte Maximum von 30 % nur in einem Fall (38,5 % Abnormitätsanteil) überschritten.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die Kombination der beiden niedrigen Vindesin-Konzentrationen mit Röntgenstrahlen bewirkte keine signifikante Erhöhung der Abnormitätsrate gegenüber der alleinigen Applikation von VDS oder von Strahlen. Nach Bestrahlung der mit 0,35 mg/kg VDS injizierten Tiere erhielt man lediglich einen der Einzeldosis des Alkaloids entsprechenden Toxizitätswert (vergleiche Tabelle 2).

Demgegenüber ergab sich eine signifikante Steigerung der Strahlenwirkung um einen Faktor von

5.3 nach vorangehender Verabreichung von 0.5 mg/kg Vindesin. Mehr als die Hälfte der untersuchten Feten (55.6 %) war geschädigt, was zum Teil mit der höheren Zahl von Ueberlebenden (39.6 %) verglichen mit Einzelanwendung von 0.5 mg/kg VDS (23.6 %) zusammenhängen dürfte. Nichtsdestoweniger ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit $p < 0.02$ statistisch gesichert. Der Kombinationseffekt übersteigt die Summe der Einzelwirkungen beider Agenzien um 12.5 % und weist somit auf einen *supra-additiven* Reaktionsmodus hin (siehe auch Abbildung 4). Die Effektsteigerung durch die kombinierte Behandlung zeichnete sich auch bei den einzelnen Würfen ab. So waren bei 4 von 15 Würfen *alle* Nachkommen abnorm, bei weiteren 3 jeweils nur ein Individuum morphologisch normal und bei 4 Würfen lag der Schädigungsanteil bei über 50 %.

Numerisch werden diese Befunde zusätzlich anhand der Interaktionsindizes (Tabelle 10) bekräftigt. Während für die beiden Gruppen 0.25 resp. 0.35 mg/kg VDS plus Röntgenstrahlen die Interaktionsindizes eine *antagonistische* Beziehung zwischen den applizierten Noxen reflektieren, erhält man nach Kombination von 0.5 mg/kg VDS + 0.9 Gy einen Wert von 1.3, also eine Wirkungszunahme auf *synergistischer* Interaktionsbasis.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass die Wechselbeziehung zwischen zwei Agenzien je nach Untersuchungskriterium ihre Modalität verändern kann. So wurde durch Bestrahlung einerseits die embryotale Eigenschaft von 0.5 mg/kg Vindesin antagonistisch herabgesetzt, andererseits die Abnormalitätsfrequenz auf eine über-additive Wirkungsweise gesteigert.

1.1.3 Wachstumshemmung

Als wachstumsgehemmt wurden all jene Feten bezeichnet, deren Gewicht mindestens 2 Standardabweichungen unterhalb des Durchschnittsgewichts der Kontrollgruppe lag.

Kontrolle.

Von den 181 Feten der Kontrolle zeichneten sich nur deren 9 (5 %) durch reduziertes Wachstum aus. Zehn der insgesamt 15 ausgewerteten Würfe waren diesbezüglich vollkommen intakt und bei den restlichen Nachkommen traten maximal 3 Retardationen pro Wurf (1 Fall) auf.

Applikation von Vindesin allein.

In der niedrigsten Dosierung (0.25 mg/kg) zeigte Vindesin generell noch keine

entwicklungshemmende Potenz. Immerhin wurde bei 5 von 9 Feten eines Wurfes (55.6%) eine Verminderung der Körpergrösse registriert. Die nächst höhere Konzentration von 0.35 mg/kg hingegen führte bereits zum signifikanten Anstieg der intrauterinen Retardationsfrequenz von 5 % (Kontrolle) auf 16.8 %. Wird dieser Wert demjenigen für Missbildungen (Tabelle 3) entgegengestellt, so wird ersichtlich, dass Entwicklungshemmung die häufigste nicht-embryonale Reaktion auf Vindesin im niedrigen Dosisbereich darstellt. Auch nach Abgabe von 0.5 mg/kg Vindesin blieb der Anteil an retardierten Feten mit 16.3 % konstant, konnte jedoch wegen der geringen Zahl überlebender Implantate (43) statistisch nicht gesichert werden.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Keine signifikante Zunahme der Retardationszahl gegenüber der Kontrolle wurde nach 0.9 Gy-Röntgenbestrahlung beobachtet. Eine Andeutung betreffend des entwicklungshemmenden Strahlenpotentials lieferten 2 Würfe mit einer Schädigungsrate von über 30 %.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die Kombination der beiden niedrigsten Vindesin-Dosen mit ionisierenden Strahlen führte zu keiner Effekterhöhung verglichen mit alleiniger Behandlung. Im Gegenteil, die erhaltenen Daten signalisieren sogar einen *antagonistischen* Wirkungsmodus zwischen dem Alkaloid und Röntgenstrahlen, wie die entsprechenden Interaktionsindizes (Tabelle 10) verdeutlichen.

Bei einer Applikation von 0.5 mg/kg VDS und Strahlen hingegen wird die Toxizitätswirkung des Chemikaliams durch die Bestrahlung um einen Faktor von 2.1 angehoben, der Unterschied zu VDS allein ist mit $p < 0.02$ statistisch gesichert. Der Kombinationseffekt von 34.5 % übertrifft die Summe der Einzelwirkungen um 11 %, die verwendeten Agenzien verstärken sich somit in ihrer Eigenschaft als Entwicklungshemmer auf supra-additiver Reaktionsbasis. Der störende Einfluss der Behandlung auf das embryo-fetale Wachstum spiegelt sich ebenfalls in den einzelnen Würfen wieder. So betrug die Retardationsrate in 3 Würfen 100 %, in einem 90 % und in weiteren 4 Würfen immerhin 50 %. Für den höheren Prozentsatz an Individuen mit veringertem Körpergrösse verglichen mit demjenigen nach separater Zugabe des Zytostatikums dürfte sicherlich auch die tiefere Sterblichkeitsfrequenz in der Kombinationsgruppe mitverantwortlich sein. Weiterhin zeigen unsere Resultate, dass bei den überlebenden Feten die Wachstumshemmung den grösseren Teil des Abnormitätsspektrums ausmacht als die Teratogenität, nämlich über 60 % (vergleiche Tabellen 2 und 3).

Die *synergistische* Wechselbeziehung zwischen 0.5 mg/kg VDS und 0.9 Gy Röntgenstrahlen

reflektiert auch der für diese Versuchsgruppe gefundene Interaktionsindex von 1.2 (Tabelle 10). Somit ergeben sich für das Kriterium "Retardation" ähnliche Interaktionsmodi wie für das Kriterium Abnormalität, nämlich Antagonismus im niedrigen und Potenzierung im höheren Dosierungsbereich.

Bei der makroskopischen Analyse von Entwicklungsstörungen sind wir auch der Frage nachgegangen, ob die Reaktion auf eine bestimmte Behandlung nicht *geschlechtsspezifischer* Natur sein könnte, ob also bei männlichen und weiblichen Nachkommen Sensibilitätsunterschiede vorhanden sind. Bezüglich der Wachstumsretardation scheint das männliche Geschlecht eine *höhere* Empfindlichkeit sowohl auf VDS allein wie auch zusammen mit Röntgenstrahlen aufzuweisen als das weibliche (siehe Tabelle 4). Obwohl diese Differenz nur für 0.25 mg/kg VDS allein statistisch gesichert ist, erfolgte auch bei den übrigen Versuchsgruppen die Reduktion des Körperwachstums häufiger bei den männlichen als bei den weiblichen Tieren.

1.1.4 Missbildungen

Die makroskopische Auswertung der nach beiden Behandlungstagen auftretenden Missbildungen umfasste mehrere Schritte. Wie Tabelle 3 zu entnehmen ist, wurde nebst Bestimmung der Gesamtzahl strukturell geschädigter Feten auch eine qualitative Unterscheidung der Abnormalitätsformen vorgenommen. Die im *Kopfbereich* erscheinenden Deformitäten können prinzipiell in 3 Gruppen aufgeteilt werden: 1. Hirnschäden, 2. Augenschäden, und 3. Gaumenspalten oder Wolfsrachen. Die vierte Gruppe umfasst alle Entwicklungsstörungen im *Gliedmassenbereich*, wie Polydaktylie oder Hypodaktylie. Die als "andere Anomalien" bezeichnete Gruppe beinhaltet alle Strukturänderungen, die zu keiner der 4 Hauptkategorien gehören (z.B. Hämorrhagien, Kyphose etc.). Zu vermerken ist, dass häufig die Feten von *mehreren* Missbildungen gleichzeitig betroffen werden. So sind Hirnschäden wie Exenzephalie vielfach mit Augenstörungen (z.B. Exophthalmie) verbunden oder Gaumenspalten mit Polydaktylie gekoppelt. In solchen Fällen wurde jeweils der schwerere, stärker vitalitätsvermindernde Missbildungsgrad in die Tabelle aufgenommen. Ansonsten würden Unstimmigkeiten entstehen zwischen dem aufgelisteten Abnormalitätsspektrum und der totalen Missbildungsrate. Somit steht in der Kolonne "Augenschäden" nur die Zahl jener Individuen, die Augendefekte in *einfacher* Form aufwiesen. Das Gleiche gilt auch für das Kriterium Extremitätsanomalien. Generell wurden bei Mehrfachschäden die Him- und Gaumenanomalien als die schwersten Missbildungsformen angesehen, während andererseits bei simultanem Auftreten von Augen- und Gliedmassendefekten die

ersteren als gravierender betrachtet wurden.

Kontrollle.

Die spontane Missbildungsrate ist mit 4.4 % als eher gering einzustufen und entspricht etwa der Frequenz von Wachstumsreduzierten (5 %). Nur 8 von insgesamt 181 Feten waren geschädigt, wobei bei 6 Tieren Wolfsrachen als häufigster Missbildungstypus angetroffen wurde. Bei keinem der untersuchten Individuen wurden Zeichen für pathologische Veränderungen des Gehirns und der Augen entdeckt.

Applikation von Vindesin allein.

Die Zugabe von Vindesin allein bewirkte von der Konzentration von 0.35 mg/kg an zwar eine gesteigerte Abnormitätsfrequenz (9.4 %), erreichte jedoch nicht die Signifikanzebene. Der grösste Zuwachs an Missgebildeten von 4.4 auf 16.3 % nach 0.5 mg/kg VDS kann angesichts des geringen Zahlenmaterials in der letztgenannten Gruppe (43 Ueberlebende) statistisch ebenfalls nicht gesichert werden.

Qualitativ gesehen lieferte die Intermediärdosis von 0.35 mg/kg bereits erste Hinweise hinsichtlich des entwicklungsstörenden Einflusses des Alkaloids auf die Augenregion (3 Fälle von Mikrophthalmie). Von den Extremitätsdefekten sei in erster Linie Hypodaktylie (Strahlreduktion) erwähnt. Als besonders schwerwiegende Missbildungsform wurde bei einem Exemplar die sogenannte Kyphose oder dorsale Krümmung beobachtet. Diese Anomalienart führt vermutlich zum Tod während der postnatalen Lebensperiode.

Die teratogene Wirksamkeit der höchsten Vindesin-Konzentration (0.5 mg/kg) scheint an Betrachtungen ausgeprägter Embryoletalität (76.4 %) eher eine unbedeutende Rolle zu spielen. Bei den 7 missgebildeten Feten traten, ähnlich der Kontrollgruppe, vornehmlich Gaumenspalten auf, während die Normogenese des ZNS nicht beeinflusst worden ist.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Nach Bestrahlung der Muttertiere am Tag 9 post conceptionem wurde keine signifikante Zunahme der spontanen Missbildungsinzidenz festgestellt. Nur gerade 4 von 138 Feten waren geschädigt, wobei in 3 Fällen Exenzephalie und in einem Fall Polydaktylie registriert worden sind.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die Bestrahlung der mit den beiden niedrigsten VDS-Dosen vorbehandelten Tiere verursachte keine signifikante Steigerung der Missbildungsfrequenz gegenüber der 0.9 Gy-Gruppe. Was das Missbildungsspektrum anbelangt, so verriet dieses den dominierenden Einfluss des Alkaloids. Es traten nämlich, wie nach VDS allein, gehäuft Extremitätsanomalien (Hypo- und Polydaktylie) auf. Die Interaktionsindizes für 0.25 und 0.35 mg/kg VDS plus Strahlung reflektieren eine *antagonistische* Wechselbeziehung zwischen den beiden Noxen.

Die Kombinationsbehandlung mit 0.5 mg/kg Vindesin + 0.9 Gy Röntgenstrahlen führte zu einer Erhöhung des Strahlenschadens von 2.9 auf 21.4 % ($p < 0.05$). Da die Summe der Einzelwirkungen beider Agenzien lediglich um 2.2 % überschritten wird (Interaktionsindex: 1.12), deuten die Ergebnisse auf eine einfache *Additivität* hin (siehe auch Tabelle 10). Verglichen mit dem synergistischen Reaktionsmodus beim Kriterium Wachstumshemmung nach Kombination der zweit-höchsten VDS-Dosis mit Strahlen lässt sich für die Missbildung kaum eine Wechselwirkung zwischen den verwendeten Noxen nachweisen (vergleiche dazu auch Abbildungen 4 und 5).

Es ist bemerkenswert, dass die Bestrahlung der mit 0.5 mg/kg injizierten Tiere die *Expressivitätsstufe* der Anomalien keineswegs steigerte, sondern nur den für die Kombinationsgruppe 0.35 mg/kg VDS + 0.9 Gy erwähnten Trend bezüglich Gliedmassendefekte noch mehr verstärkte. Von total 18 missgebildeten Feten wiesen deren 10 Hypodaktylie (1 Tier zusätzlich auch Mikrozephalie) und weitere 2 Polydaktylie auf. Die prozentuale Häufigkeit von Extremitätsanomalien betrug 13.1 % gegenüber nur 4.6 % nach alleiniger Zugabe der Substanz. Weitere Missbildungsarten waren Wolfsrachen, Mikrozephalie (kombiniert mit Hypodaktylie oder Mikrophthalmie) und Rückenkrümmung (Kyphose) gekoppelt mit Hypognathie. Interessanterweise kam die Hirnverkleinerung, die kleinste VDS-Dosis ausgenommen, ausschliesslich nach kombinierter Anwendung beider Agenzien vor (siehe Tabelle 3).

Es wurde bereits angedeutet, dass die Fetopathien einzeln oder aber auch in *pluraler* Form auftreten können. Somit ist nicht nur die Inzidenz und der Schweregrad der vorgefundenen Missbildungen für die Beurteilung der Teratogenitätspotenz eines Agens von Bedeutung, sondern auch dessen Fähigkeit, Mehrfachschäden zu induzieren. Tabelle 9 gibt Auskunft betreffend deszuletzt genannten Kriteriums. Unsere Untersuchungen zeigen, dass in allen Versuchsgruppen die Einzelmissbildung den häufigsten Befund darstellt. Die Verabreichung von 0.35 und 0.5

mg/kg VDS, allein oder zusammen mit Bestrahlung, führte zwar auch zu Mehrfachmissbildungen, deren Anteil bewegt sich jedoch nur im Bereiche einiger Prozente.

Interessante Ergebnisse lieferte die Analyse des Geschlechtsverhältnisses bei missgestalteten Mausfeten (Tabelle 4). Es wurde nämlich festgestellt, dass, umgekehrt wie bei Wachstumsretardierten, nach Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit VDS die weiblichen Nachkommen häufiger entwicklungsgestört werden als die männlichen. So wurden beispielsweise nach Zugabe von 0.35 mg/kg VDS + 0.9 Gy doppelt so viele weibliche wie männliche Tiere geschädigt (13.9 resp. 6.6 %). Noch krasser wird der Unterschied in der Kombinationsgruppe mit 0.5 mg/kg VDS, wo dem hohen Prozentsatz missgebildeter Weibchen (33.3 %) lediglich 9.5 % gleichermassen betroffener Männchen entgegenstehen ($p < 0.05$).

1.1.5 Gesamtschädigung

Als Gesamtschädigung bezeichnen wir in unseren Untersuchungen die Summe der toten und abnormen (d.h. missgebildeten und retardierten) Nachkommen bezogen auf die gesamte Implantationszahl.

Applikation von Vindesin allein.

Die Dosis-Effekt-Kurve für Vindesin allein (Abbildung 6) zeigt bereits von der eher geringen Konzentration von 0.35 mg/kg an einen recht steilen Anstieg der Toxizitätswirkung des Alkaloids. Die Gesamtschädigungsrate betrug mit 43 % das 2.2-fache des Kontrollwertes ($p < 0.002$), wobei die Prozentualanteile an Toten und Abnormen etwa gleich hoch waren.

Wie aus der Graphik weiterhin ersichtlich wird, vermehrte sich nach Zugabe von 0.5 mg/kg VDS die Schädigungsfrequenz um weitere 40.5 %, die Kurve verläuft also fast linear. Bereits an anderer Stelle wurde erwähnt, dass nach Abgabe dieser Dosis die Mehrheit der Implantate frühletal geschädigt wurde (76.4 %), während die Abnormalitätsinzidenz mit 7.1 % der gesamten Stichprobengrösse nur wenig ins Gewicht fällt. Somit hätte vermutlich auch eine tiefere Konzentration als diejenige von 1 mg/kg VDS ausgereicht, um die maximale Toxizität von 100 % auszulösen.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Auch nach dem Zusammenzählen aller embryo-toxischen Strahleneinflüsse wird ersichtlich, dass die Exposition mit 0.9 Gy am Tag 9 die pränatale Mausentwicklung in keinerlei Hinsicht

beeinträchtigt. Offen bleibt, ob bei ausbleibenden grob-morphologischen Effekten zelluläre Strahlenschäden ebenfalls auszuschliessen sind. Die vorliegenden Daten lassen jedenfalls den Schluss zu, dass allfällige Störungen innerhalb von 9 Tagen (Zeitspanne zwischen Bestrahlung und Untersuchung) mit Hilfe des embryonalen Erholungspotentials repariert werden können.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die nach kombinierter Anwendung von Vindesin und Strahlung erhaltene Dosis-Effekt-Kurve verläuft praktisch identisch wie jene für VDS allein. Noch am ehesten tritt eine Wechselbeziehung der beiden Agenzien nach 0.35 mg/kg VDS und Röntgenstrahlen in Erscheinung. Die Gesamtschädigungsrate in dieser Gruppe ist um 10.3 % kleiner als nach einfacher VDS-Applikation (Tabelle 2). Solche *Unterdrückung* der Toxizität des Zytostatikums im Kombinationsversuch wurde bereits für das Kriterium Mortalität festgestellt.

Hingegen findet man keine Hinweise über Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Noxen für die 0.5 mg/kg VDS + 0.9 Gy-Gruppe. Es sei daran erinnert, dass die Vorbehandlung mit der zweit-höchsten VDS-Dosis ansonsten ein sehr breites Interaktionsspektrum (Antagonismus bis Synergismus) hervorgerufen hat. Im vorliegenden Fall erhält man jedoch nur einen der Embryotoxizität von VDS allein entsprechenden Häufigkeitswert.

1.2 Behandlung am Tag 8 der Gestation

1.2.1 Mortalität

Applikation von Vindesin allein.

Im Vergleich zur Behandlung am Tag 9 reagiert das jüngere Entwicklungsstadium (Tag 8) weit weniger empfindlich auf das Zytostatikum. So erhöhte die Dosis von 0.35 mg/kg Vindesin die Embryoletalität nicht, während bereits ein Tag später die gleiche Konzentration eine Verdoppelung der spontanen Mortalitätsrate verursachte (vergleiche Tabellen 5 und 1). Noch deutlicher wird die Empfindlichkeitsverminderung in der 0.5 mg/kg-Gruppe. Obwohl der Prozentsatz an abgestorbenen Implantaten das 4.6-fache des Kontrollwertes (8.2 %, $p < 0.002$) beträgt, ist trotz dieser Wirkungssteigerung die Sterblichkeitsfrequenz nur halb so hoch wie nach Behandlung am Tag 9 der Gestation (73.6 %).

Bemerkenswerterweise entfaltet die abgegebene Dosis von 0.5 mg/kg ihre letale Wirkung nicht nur sofort, sondern auch mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung. So waren von insgesamt

70 Toten deren 14 (20 %) spätletal geschädigt, ihr Ableben erfolgte somit erst gegen Ende der vorgeburtlichen Lebensperiode. Nach Behandlung am Tag 9 betrug der Anteil an Spättoten lediglich 3,6 % der Gesamtmortalität.

Die höchste Konzentration von Vindesin (1 mg/kg) hingegen wirkte bereits kurz nach Applikation letal, bis auf 2 Feten befanden sich alle abgestorbene Implantate im stark resorbierten Zustand. Auch in dieser Versuchsgruppe wird jedoch die gegenüber Tag 9 verringerte Schädigungspotenz des Alkaloids ersichtlich. So konnten immerhin fast 40 % der Nachkommen überleben, wobei zu vermerken ist, dass die Mortalitätsrate in 9 von 14 Würfen das Maximum von 100 % betrug. Da in den restlichen 5 Würfen nie mehr als 1 bis 3 Tiere betroffen waren, scheint die Letalitätswirkung des Vindesins auf eine kritische Empfindlichkeitsperiode während der Organogenese ausgerichtet zu sein. Diese Tendenz zeichnete sich bereits in der 0,5 mg/kg VDS-Gruppe ab, nur 6 von 15 Würfen wiesen eine vom Kontrollbild abweichende Schädigungsfrequenz (mehr als 30 %) auf. Aus allen diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass hinsichtlich des Kriteriums Letalität eine sehr stark ausgeprägte *Stadiumspezifität* vorliegt.

Obwohl die quantitative Reaktion auf Vindesin am Tag 8 deutlich schwächer ausfällt als am Tag 9, bestehen Parallelen zwischen den beiden Entwicklungsstadien in bezug auf den *Schwellenwert* für embryoletale Schädigung. Dieser muss, wie am Tag 9, ebenfalls im Bereiche zwischen 0,35 und 0,5 mg/kg liegen, wie auch anhand des sprunghaften Anstiegs der Dosis-Effekt-Kurve (Abbildung 3) ab der zuletzt erwähnten Konzentration belegt werden kann.

Bestrahlung mit 0,9 Gy.

Auch am Tag 8 der Gestation wurde die Zahl spontan auftretender Todesfälle durch die Bestrahlung nicht erhöht. Ebenfalls in den einzelnen Würfen konnten nirgends Anzeichen für eine gesteigerte Strahlenschädigung festgestellt werden. Hinsichtlich des Kriteriums Mortalität präsentieren sich Röntgenstrahlen somit zu beiden Expositionszeitpunkten als ein inaktives Agens. Diese Befunde bestätigen das allgemein bekannte Phänomen, dass ionisierende Strahlen vornehmlich in der Präimplantationsperiode letal wirken, während in der Organogenese hauptsächlich Entwicklungsstörungen induziert werden.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Von besonderem Interesse war die Frage, ob vor allem die Kombination von nicht-

embryoletalen Vindesin-Konzentrationen (0.25 und 0.35 mg/kg) mit Strahlen eine Reaktionsverstärkung herbeiführt. Wie aus der Tabelle 5 hervorgeht, sterben nach Applikation von 0.25 mg/kg VDS und 0.9 Gy zwar mehr Feten als nach Bestrahlung allein, der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Immerhin entspricht der Kombinationseffekt mit 11 % etwa der Summe der Einzelwirkungen (12 %), wie auch der errechnete Interaktionsindex von 0.91 (Tabelle 10) andeutet. Somit bestehen bereits für die niedrigste VDS-Dosierung zumindest Ansätze einer *additiven* Reaktionsweise mit Röntgenstrahlen.

Demgegenüber war die Mortalitätsrate nach Vorbehandlung der Muttertiere mit 0.35 mg/kg VDS um einen Faktor von 3.1 (20.9 %, $p < 0.02$) höher als nach Bestrahlung allein. Da im vorliegenden Fall die Summe der Einzeleffekte um 8 % überschritten wird, kann von einer *synergistischen* Wechselbeziehung zwischen den beiden Noxen gesprochen werden. Der Interaktionsindex von 1.61 reflektiert ebenfalls eine supra-additive Reaktionsverstärkung. Das Potenzierungsausmass der Strahlenwirkung durch Vindesin widerspiegeln insbesondere jene zwei Würfe, die eine Resorptionsfrequenz von 57.1 bzw. 100 % (!) aufwiesen.

Nach Bestrahlung der mit 0.5 mg/kg VDS injizierten Mäuse kam einzig die Toxizitätswirkung des Zytostatikums in alleiniger Verabreichung zum Vorschein. Der auf eine *antagonistische* Beziehung hinweisende Interaktionsindex von 0.78 liegt im gleichen Bereich wie jener am Tag 9 (0.71). Während jedoch am Tag 9 die Röntgenstrahlen die Effektivität des Chemikaliams reduzierten, scheint im vorliegenden Fall eher die Strahlenwirkung durch das Zytostatikum unterdrückt zu werden.

Abweichende Verhältnisse findet man nach Kombination der höchsten VDS-Dosis (1 mg/kg) mit Röntgenstrahlen. Im Vergleich zur separaten Anwendung des Alkaloids erhöhte sich der Anteil an Postimplantationsverlusten von 63.8 auf 89.5 %, wobei die Additivitätsebene um 18.9 % überschritten wird. Somit ist ein synergistischer Interaktionsmodus zwischen Vindesin und Strahlung keineswegs nur auf den nicht-toxischen Dosierungsbereich der Substanz beschränkt. Die durch Nachbestrahlung gesteigerte Schädigungskapazität des Zytostatikums kann auch dadurch eindrücklich veranschaulicht werden, indem die Behandlung bei 11 von insgesamt 13 Würfen zum Tode sämtlicher Implantate führte.

1.2.2 Abnormalität

Kontrolle.

Die absoluten und relativen Abnormalitätsfrequenzen in den verschiedenen Versuchsgruppen sind in der Tabelle 6 aufgelistet. Der Prozentsatz an spontan auftretenden Entwicklungsstörungen ist mit 4 % als sehr gering zu bezeichnen und erreicht nur die Hälfte der Letalitätsrate (8.2 %). Was die Schädigungshäufigkeit pro Einzelwurf anbelangt, so wurden in lediglich 4 von insgesamt 17 Würfen sporadisch auftretende Fetopathien beobachtet. Der Höchstwert kann mit 26.7 % (4 von 15 Feten eines Wurfs morphologisch abnorm) angegeben werden.

Applikation von Vindesin allein.

Mit der niedrigsten Konzentration von VDS (0.25 mg/kg) wurden zwar doppelt so viele Anomalien erzeugt wie bei der Kontrolle (9.4 %), der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist jedoch nicht signifikant. Hervorzuheben sind insbesondere zwei Würfe mit deutlich über dem Kontrollbereich liegenden Schädigungsanteilen von 37.5 resp. 50 %. Bemerkenswert ist weiterhin, dass unabhängig vom Applikationszeitpunkt (Tag 8 oder 9) diese Dosis am Untersuchungstag jeweils zur gleichen Abnormalitätsinzidenz führte (vergleiche Tabellen 6 und 2). Die Injektion von 0.35 mg/kg Vindesin steigerte die spontane Schädigungsfrequenz signifikant um einen Faktor von 3.3 (13.2 %). Dies zeigt, dass die Schwellendosis für die Induktion von Entwicklungsstörungen tiefer liegt als diejenige für das Kriterium Mortalität. Weiterhin zeigen diese Befunde, dass das ältere Entwicklungsstadium viel empfindlicher auf Vindesin reagiert als das jüngere. Verglichen mit Tag 8 verschiebt sich die Schwellendosis für nicht-letale Pränatalschäden noch weiter nach unten (siehe Abbildung 4) und die gleiche Konzentration (0.35 mg/kg) ist doppelt so effizient wie 24 Stunden zuvor.

Die nächst-höhere VDS-Konzentration (0.5 mg/kg) vermehrte die Abnormalitätsrate bereits auf das 5.7-fache des Kontrollwertes ($p < 0.002$). Verglichen mit Tag 9 wirkt diese Dosis weniger letal als anomalienerzeugend, die Resorptionsfrequenz ist lediglich 15 % höher als der Anteil an entwicklungsgestörten Feten (22.6 %). In den einzelnen Würfen ergeben sich folgende Verhältnisse: in 11 von insgesamt 15 Würfen war weder die Zahl von Ueberlebenden (8-12 Tiere/Wurf) noch diejenige von Abnormen (maximal 5 Feten/Wurf) drastisch herabgesetzt. Eine verstärkte Reaktion auf das Zytostatikum zeigten somit lediglich 4 Würfe, in denen Sterblichkeitsrate (1-3 Ueberlebende/Wurf) und Abnormalitätsanteil (2 Würfe 100 % und weitere zwei 66.7 bzw. 50 %) ausserordentlich hoch waren. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die

Feten gleichermassen am Weiterleben wie auch in ihrer Normalentwicklung gehindert werden, falls die Behandlung zu einem kritischen Zeitpunkt erfolgt. Es ist auch interessant, dass ungeachtet der erhöhten Dosierung sich die Wirkung des Alkaloids eher in einer Hemmung des Pränatalwachstums äussert als in teratogenen Effekten. Von total 26 abnormen Tieren wiesen deren 19 (73 %) eine verminderte Körpergrösse auf.

Wie der Dosis-Wirkung-Kurve (Abbildung 4) entnommen werden kann, erfolgt von der höchsten Konzentration des Chemikaliums (1.0 mg/kg) an ein Absinken der Abnormitätsfrequenz auf das Kontrollniveau. In dieser Versuchsgruppe bewirkt das Zytostatikum somit hauptsächlich Postimplantationstod (63.8 %). Lediglich 3 von 63 Ueberlebenden (4.8 %) zeichneten sich durch Entwicklungsanomalien aus. Diese geschädigten Feten stammen aus 3 von insgesamt 5 Würfen (9 Würfe: Tod sämtlicher Implantate) mit einer der Kontrolle entsprechenden Ueberlebensrate. Aus diesen Befunden geht hervor, dass die Schädigungspotenz des Vindesins in der gegebenen Dosierung einem Alles-oder-Nichts-Gesetz folgt. Entweder gehen alle Embryonen schon kurz nach Applikation des Zytostatikums zugrunde, oder aber sie setzen ihre Normalentwicklung ungestört fort.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Während die nicht-letale Schädigungskapazität Vindesins am Tag 8 zumindest für die beiden Dosierungen 0.35 und 0.5 mg/kg deutlich geringer ausfällt als am Tag 9, verhält es sich mit jener der Röntgenstrahlen genau umgekehrt. So nahm nach Bestrahlung die spontane Abnormitätsinzidenz signifikant um einen Faktor von 5 (19.8 %, $p < 0.02$) zu. Dies bedeutet, dass das frühere Entwicklungsstadium fast doppelt so strahlenempfindlich ist wie das spätere (vergleiche Tabellen 6 und 2). In den einzelnen Würfen wurde teilweise ein noch viel höherer Anstieg der Schädigungsrate registriert als der tabellarische Häufigkeitswert anzeigt. So betrug der Anteil an Embryopathien in 3 von insgesamt 15 Würfen mehr als 30 % und in einem Fall wiesen 12 von 15 Implantaten (80 %) Entwicklungsstörungen auf. Zu vermerken ist auch, dass der Strahleninsult deutlich häufiger zu teratogenen Effekten führt als zur Wachstumshemmung. Von 38 abnormen Feten waren lediglich 13 retardiert, hingegen fast doppelt so viele (25) missgebildet.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die Vorbehandlung mit 0.25 mg/kg VDS erhöhte die strahleninduzierte Schädigungsrate signifikant von 19.8 auf 34.7 %. In 6 von total 17 Würfen bewegte sich die Abnormitätsfrequenz im

Bereiche zwischen 30-60 % und in weiteren zwei wurden Maximalwerte von über 80 % vorgefunden. Vom Interaktionsmodus her scheinen sich die Wirkungen beider Agenzien zu addieren, da die Summe der Einzeleffekte lediglich um 5.5 % überschritten wird. Dafür spricht auch der ermittelte Interaktionsindex von 1.19 (Tabelle 10). Somit würde man die Art der Wechselbeziehung zwischen den verwendeten Noxen bestenfalls als leicht über-additiv bezeichnen.

Dass die Wirkungssteigerung im Kombinationsversuch eher auf die erhöhte Wirksamkeit der Strahlung als auf diejenige des Zytostatikums zurückgeht, kommt dadurch zum Ausdruck, indem die teratogene Reaktion den grössten Schädigungsanteil beansprucht (2/3 der Abnormitätsrate entfällt auf Missbildungen). Die strahlensensibilisierende Kapazität der abgegebenen VDS-Konzentration bewirkt unter anderem, dass sich der Prozentsatz an entwicklungsgestörten Feten gegenüber Tag 9 um das 4.6-fache erhöht, der Unterschied zwischen den beiden Behandlungsstadien ist mit $p < 0.002$ statistisch hoch signifikant.

Die höchste Potenzierung des Strahlenschadens, nämlich um einen Faktor von 2.6, wurde mit 0.35 mg/kg Vindesin ausgelöst. Die Hälfte der überlebenden Nachkommen (50.7 %) wies eine gestörte Normalentwicklung auf. Ähnlich wie nach Kombinationsbehandlung mit der tiefsten VDS-Dosis bestand auch im vorliegenden Fall die nicht-embryotale Reaktion in erster Linie in teratogenen Effekten. Von 71 abnormen Feten waren 44 (62 %) missgebildet und lediglich 27 (38 %) wachstumsretardiert.

Da der Kombinationswert 17.7 % über der Additivitätsebene liegt, kann von einem *synergistischen* Interaktionsmodus zwischen den beiden Faktoren gesprochen werden. Die supra-additive Wirkungsweise widerspiegelt auch der Interaktionsindex (1.54). Die Kombinationskurve (Abbildung 4) zeigt, dass die strahlensensibilisierende Potenz von 0.35 mg/kg VDS weder von der niedrigsten noch von der nächst-höheren Konzentration übertroffen wird.

Weiterhin kann aus den Befunden abgeleitet werden, dass: a) die synergistische Effektsteigerung für das Kriterium Abnormalität deutlicher ausfällt als für das Kriterium Mortalität (lediglich 8 % höher als die Summe der Einzelwirkungen) und b) die Entwicklungsstörung die Hauptreaktion auf die Kombinationsbehandlung mit 0.35 mg/kg VDS + Röntgenstrahlen darstellt (vergleiche Tabellen 5 und 6). Die Verstärkung des Strahlenschadens durch das Alkaloid kommt in den einzelnen Würfen noch krasser zum Ausdruck. So betrug der Abnormalitätsanteil in 2 Würfen 100 % (bei 11 resp. 12 Implantaten) und bei weiteren 3 Würfen zwischen 60 und 76 %.

Der nach kombinierter Applikation von 0.5 mg/kg VDS und Röntgenstrahlen erhaltene Schädigungswert von 33.9 % ist nur 11.3 % höher als die Toxizitätswirkung von Vindesin

allein. Trotz der erhöhten Konzentration des Chemikaliums wird die Strahlenreaktion lediglich um einen Faktor von 1.7 gesteigert, was bereits nach Vorbehandlung mit der tiefsten VDS-Dosis (0.25 mg/kg) registriert werden konnte. Dass das Reaktionsausmass in der vorliegenden Versuchsgruppe deutlich geringer ausfällt als nach Behandlung mit 0.35 mg/kg VDS + 0.9 Gy geht auf den *sub-additiven* Interaktionsmodus beider Agenzien zurück (die Kombinationswirkung liegt 8.6 % unterhalb der Additivitätsgrenze). Der Interaktionsindex von 0.8 spricht ebenfalls für eine antagonistische Wechselbeziehung zwischen der Substanz und Röntgenstrahlen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirkungsweise des Vindesins mit ionisierenden Strahlen ausser von der Konzentration des Alkaloids auch vom Behandlungszeitpunkt abhängt. So führten die Kombinationsversuche am Tag 9 zur synergistischen Reaktionsverstärkung nur nach Vorbehandlung mit 0.5 mg/kg Vindesin.

Wie bereits im Abschnitt Mortalität erwähnt wurde, bewirkt die Strahlenexposition der mit 1.0 mg/kg Vindesin injizierten Tiere das Absterben der meisten Implantate (89.5 %). Von den 13 überlebenden Tieren waren zudem 9 (69.2 %) morphogenetisch geschädigt, wobei 6 Tiere Organmissbildungen aufwiesen. Trotz des extrem hohen Letalitätseffekts kann ausgesagt werden, dass in dieser Kombinationsgruppe die Abnormitätswirkung gegenüber der Einzelzugabe des Zytostatikums ebenfalls gesteigert wird. Es sei daran erinnert, dass Vindesin in separater Verabreichung kaum strukturelle Defekte induzierte (siehe Tabelle 6). Interessant ist auch, dass in einem von lediglich 2 überlebenden Würfen alle Nachkommen (4) normal, in dem anderen bei *fehlender* Mortalität hingegen sämtliche Implantate (9) entwicklungsgestört waren.

1.2.3 Wachstumshemmung

Kontrolle.

Bei den Kontrolltieren kommt eine Verminderung der Körpergrösse mit äusserster Seltenheit vor. Von insgesamt 201 lebenden Feten zeichneten sich lediglich 4 (2 %) durch Wachstumshemmung aus, der Prozentsatz liegt somit noch tiefer als am Tag 9 der Gestation (5 %).

Applikation von Vindesin allein.

Die beiden niedrigsten VDS-Konzentrationen bewirken keine signifikante Zunahme der Retardationsfrequenz gegenüber der Kontrolle. Während jedoch die Injektion von 0.25 mg/kg Vindesin an beiden Behandlungstagen zur gleichen Schädigungshäufigkeit (5 %) führt, ist der Anteil an

betroffenen Feten nach 0.35 mg/kg VDS am Tag 8 signifikant niedriger als am Tag 9 (6 bzw. 16.8 %).

Die geringere Empfindlichkeit auf das Zytostatikum gegenüber dem älteren Embryonalstadium wird auch dadurch ersichtlich, indem erst die höhere Konzentration von 0.5 mg/kg das Effekt im signifikanten Ausmass steigerte (Tabelle 7). Die Schädigungsrate von 16.5 % wurde in der gleichen Grössenordnung ein Tag später bereits durch 0.35 mg/kg VDS erzielt, die Schwelendosis bezüglich des Kriteriums Entwicklungshemmung liegt somit während der früheren Organogenese im höheren Dosierungsbereich des Chemikaliiums als am Tag 9 post conceptionem. Die 63 überlebenden Feten nach Abgabe von 1.0 mg/kg Vindesin unterschieden sich schliesslich weder gewichts- noch grössenmässig von den unbehandelten Nachkommen.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Es wurde bereits angedeutet, dass sich die embryotoxische Wirkung von 0.9 Gy Röntgenstrahlen am Tag 8 vorrangig in teratogenen Effekten äussert. Das Pränatalwachstum wird durch die Strahlenexposition kaum beeinträchtigt, nur 13 von 192 Feten (6.8 %) wichen in ihrem Gewicht um mehr als zwei Standardabweichungen vom Kontrollwert ab. Der leichte Anstieg der Retardationsfrequenz gegenüber der Referenzgruppe geht vornehmlich auf einen erhöhten Schädigungsanteil (28.6 %) bei Implantaten eines einzigen Wurfes zurück.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Bei der niedrigsten VDS-Dosis (0.25 mg/kg) wurde zusammen mit Bestrahlung die Wirkung gegenüber der separaten Anwendung beider Noxen verstärkt (allerdings nicht signifikant). Der Häufigkeitswert von 11.9 % entspricht ziemlich exakt der Summe der Einzeleffekte, was auch der Interaktionsindex von 1.01 bestätigt. Erwähnenswert ist auch der Maximalschaden von 46.2 % (6 von 13 Feten eines Wurfes betroffen), der ebenfalls als ein Zeichen für eine Wirkungssteigerung im Kombinationsversuch bewertet werden kann.

Im Vergleich zu der nur bestrahlten Gruppe vergrösserte sich der Prozentsatz an wachstumsblockierten Feten nach Vorbehandlung mit 0.35 mg/kg VDS von 6.8 auf 19.3 %, also um einen Faktor von 2.8. Dieser Wert ist um 6.5 % höher als die Summe der Einzelwirkungen, der Kombinationseffekt spricht somit für eine *supra-additive* Reaktionsverstärkung beider Agenzien. Den synergistischen Wirkungsmodus reflektiert auch der Interaktionsindex von 1.51 (Tabelle 10). Dass der Schadenzuwachs gegenüber der Einzelbehandlung statistisch nicht gesichert werden kann, liegt vermutlich an der relativ kleinen Zahl betroffener Würfe. Nur 3

von total 12 überlebenden Würfen wiesen einen starken Anstieg der Retardationsrate (zwischen 45 und 58 %) auf.

Die Inzidenz geschädigter Feten nach kombinierter Applikation von 0.5 mg/kg VDS und 0.9 Gy Röntgenstrahlen entspricht mit 16.1 % der Embryotoxizität des Alkaloids in alleiniger Verabreichung (siehe Tabelle 7). Vom Interaktionsindex (0.69) her müsste das Ergebnis mit einer antagonistischen Wechselbeziehung zwischen den angewandten Noxen erklärt werden.

Die Bestrahlung der mit 1.0 mg/kg injizierten Tiere führte zu einem höheren Prozentsatz an Wachstumsretardationen als bei den übrigen Kombinationsgruppen (23.1 %). Diese Zunahme geht allerdings einzig auf eine geringe Zahl Ueberlebender (13 Feten) zurück. Immerhin bestehen zumindest Anzeichen dafür, dass Vindesin und Strahlen gemeinsam die Entwicklung hemmen können, während die beiden Agenzien alleine diesbezüglich keine Wirksamkeit aufweisen.

Zusammenfassend zeigte die Studie, dass hinsichtlich des Kriteriums Wachstumshemmung die Kombinationsbehandlung mit den beiden niedrigen VDS-Konzentrationen (0.25 und 0.35 mg/kg) am Tag 8 effizienter ist als am Tag 9 der Gestation (Tag 8: Reaktionsmodus additiv bis überadditiv, Tag 9: antagonistisch). Hingegen löst 0.5 mg/kg VDS zusammen mit Röntgenstrahlen am Tag 9 eine synergistische Wirkungssteigerung aus, währenddessen beim jüngeren Entwicklungsstadium lediglich ein antagonistischer Beziehungsmodus resultiert.

Parallelen zu den Befunden nach Behandlung am Tag 9 bestehen in bezug auf das Geschlechtsverhältnis bei den wachstumsretardierten Mausfeten, indem die männlichen Tiere deutlich empfindlicher auf das Zytostatikum in einfacher oder kombinierter Verabreichung reagieren als die weiblichen. Die Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern sind für die meisten Versuchsgruppen statistisch gesichert (Tabelle 8). Besonders krass kommt diese Differenz nach Applikation von 0.5 mg/kg VDS allein (Männchen: 27.1 %, Weibchen: 5.4 %) oder zusammen mit Bestrahlung (Männchen: 25.4 %, Weibchen: 7.7 %) zum Ausdruck.

1.2.4 Missbildungen

Kontrolle.

Spontan treten Missbildungen genauso selten auf wie die Wachstumsretardationen (2 %). An Organschäden wurden Exenzephalie (1), Wolfsrachen (2) und Polydaktylie (1) gefunden.

Applikation von Vindesin allein.

Wie Tabelle 7 zeigt, bewirkt Vindesin in keiner Dosierung eine signifikante Vermehrung von Organschäden gegenüber der Kontrolle. Die Anomalienrate bewegt sich im Bereiche zwischen 4.4 % (0.25 mg/kg) und 7.1 % (0.35 mg/kg). Aufschlussreicher sind die qualitativen Befunde. So induzieren die beiden niedrigen VDS-Konzentrationen fast ausschliesslich Polydaktylie der Vorderextremitäten (0.25 mg/kg VDS: 7 von 8 Missgebildeten, 0.35 mg/kg: 12 von 13 Missgebildeten), während schwere Fetopathien wie Hirnbruch oder Wolfsrachen nur sporadisch erscheinen. Hypodaktylie, wie sie nach Behandlung am Tag 9 der Gestation noch recht häufig angetroffen wurde, konnte nicht festgestellt werden. Ebenfalls wurden in keiner Versuchsgruppe Anzeichen für einen schädigenden Einfluss des Alkaloids auf die Augenentwicklung bemerkt. Während Vindesin in höheren Konzentrationen (0.5 und 1.0 mg/kg) praktisch keine Gliedmassendefekte mehr induziert, wurden nach Applikation von 0.5 mg/kg als ein neuer Teratogenitäts-effekt *Ohrenmissbildungen* entdeckt. Bei den betroffenen Feten (3) waren die beiden Ohrmuscheln stark reduziert (Mikrotie) und zudem proximalwärts displaziert. In einem Fall kam es sogar zur Bildung eines zusätzlichen, allerdings reduzierten Ohrapparats.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Werden die Muttertiere der Strahlendosis von 0.9 Gy ausgesetzt, so erhöht sich die Zahl missgebildeter Nachkommen gegenüber der Kontrolle signifikant von 2 auf 13 %. Insbesondere der Maximalwert von 73.3 % (11 von 15 Feten eines Wurfes missgebildet) unterstreicht die Schädigungskapazität dieses Agens. Die vorliegenden Daten beweisen, dass Röntgenstrahlen hauptsächlich teratogen wirken. Zudem wird ersichtlich, dass das Embryonalgewebe am Tag 8 der Gestation um einen Faktor von 4.5 strahlensensibler ist als 24 Stunden später.

In qualitativer Hinsicht stellen Hirnanomalien (Exenzephalie und Hydrozephalie) die dominierende Missbildungsform dar. Von total 25 abnormen Feten zeigten 18 (9.4 %) pathologische Veränderungen des ZNS. Neben den Gehirn werden im Kopfbereich auch die Augen besonders häufig durch den Strahleninsult geschädigt. Dies ist vor allem funktionell bedingt, da die Augen als ein durch das ZNS induziertes Organ bei gestörter Neurogenese in ihrer Entwicklung ebenfalls beeinträchtigt werden. Bis auf einen Fall von Mikrophthalmie traten Augenmissbildungen darum meist zusammen mit Himdefekten, vorwiegend mit Exenzephalie, auf. So zeichneten sich 9 von 17 Hirnbruch-tragenden Tieren durch ein- oder beidseitige Exophthalmie (fehlende Augenlider) und weitere 3 durch Anophthalmie (ebenfalls gekoppelt mit Hirnbruch oder Hydrozephalus) aus. Restliche Anomalien waren Wolfsrachen (1), Polydaktylie (4) und

Schwanzreduktion (1). Erwähnenswert ist auch ein Fall von *Anotie* (fehlende Ohren), einer nur in dieser Versuchsgruppe beobachteten Missbildungsart.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Nach einer kombinierter Applikation von 0.25 mg/kg VDS und Röntgenstrahlen vergrösserte sich der Prozentsatz an strahlengeschädigten Feten um weitere 9.7 % ($p < 0.05$). Mit 22.8 % übersteigt die Missbildungsfrequenz die Summe der Einzeleffekte um 5.3 %, die Reaktionssteigerung deutet somit auf eine *supra-additive* Wechselbeziehung zwischen den beiden Noxen hin. Bestätigt wird diese Aussage auch durch den Interaktionsindex von 1.31 (Tabelle 10).

Wie das Abnormitätsspektrum zeigt, wurde durch das Chemikalien insbesondere der Anteil an strahleninduzierten Gehirnanomalien erhöht (von 9.4 auf 12.4 %). Eine Parallele zur bestrahlten Gruppe besteht darin, dass die Exenzephalie (20 Tiere) viel mehr verbreitet ist als Hydrozephalie (4 Feten) und Mikrozephalie (1 Fet) sowie Augendefekte die zweit-häufigste Missbildungsform darstellen. Bei der letztgenannten Organschädigung handelte es sich vornehmlich um Exophthalmien (12 Tiere), während Ano- oder Mikrophthalmien (2 bzw. 4 Feten) zahlenmässig deutlich unterlegen waren. Zu vermerken ist, dass von den 18 mit Augenschäden behafteten Implantaten deren 16 gleichzeitig auch schwere Gehirmpathien aufwiesen.

Im Kopfbereich sind noch zwei Missbildungsarten, die weniger numerisch als qualitativ interessant sind, hervorzuheben. Bei der ersten Abnormitätsform handelt es sich um *Ohrschäden*, wie sie bereits nach 0.5 mg/kg Vindesin beschrieben worden sind. Die solchermassen betroffenen Individuen (5) zeigten eine Verkleinerung (Mikrotie) und Verschiebung der Hörorgane, wobei in drei Fällen die Ohrmissbildungen mit einem Hirnbruch verbunden waren. Der zweite Abnormitätstypus, die sogenannte *Hypognathie* (Unterkiefer-Reduktion) wurde bei 3 Feten (2 davon zusätzlich mit Wolfsrachen) beobachtet. Werden alle auf die Kopfregion beschränkten Entwicklungsstörungen (Gehirn-, Augen-, Ohren- und Gaumenspalten) zusammengezählt, so ergibt sich eine signifikante Steigerung der Kopfschädeninzidenz (16.3 %) gegenüber der strahlenexponierten Referenzgruppe (9.9 %, $p < 0.05$). Der Einfluss des Alkaloids im Kombinationsversuch drückt sich im vermehrten Auftreten von Extremitätsanomalien (Polydaktylie, 14 Tiere) aus, welche die dritt-häufigste Abnormitätsart repräsentieren.

Die strahlensensibilisierende Potenz des Zytostatikums erreicht in der Konzentration von 0.35 mg/kg ihren Höchstwert (siehe auch Abb. 5). Im Vergleich zu der nur bestrahlten Gruppe erhöhte sich der Prozentsatz an Missgebildeten um einen Faktor von 2.4 (31.4 %, $p < 0.02$)

und die Additivitätsebene wurde um mehr als 11 % überschritten. Der *synergistische* Interaktionsmodus zwischen den beiden Agenzien ist somit deutlich ausgeprägter als nach der Vorbehandlung mit 0.25 mg/kg VDS, wie auch der Interaktionsindex von 1.56 bestätigt.

Die makroskopische Analyse der einzelnen Fetalorgane ergab, dass die Strahlenempfindlichkeit des pränatalen ZNS durch die Zugabe von 0.35 mg/kg VDS erheblich gesteigert wird. Der Prozentsatz an Hirnschäden (vor allem Exenzephalie) betrug mit 20 % das Doppelte desjenigen in der 0.9 Gy-Gruppe. In bezug auf die Augenstörungen besteht zumindest eine Tendenz zur Reaktionsverstärkung im Kombinationsversuch (11.4 % gegenüber 6.8 % nach Bestrahlung allein).

Eine besonders drastische Missbildungsform wurde bei zwei Feten beobachtet: der sogenannte *Gesichtsspalt* oder Gnathoschisis. Diese, immer zusammen mit Hirnbruch auftretende, Abnormalität wurde nur noch nach Vorbehandlung mit 0.5 mg/kg VDS (1 Fall) vorgefunden und deutet auf eine äusserst starke Beeinträchtigung der Organogenese hin. Obwohl quantitativ vernachlässigbar, kann somit rein vom Schweregrad einer solchen Strukturdeformität her das Zerstörungsausmass der gemeinsamen Applikation des Onkolykums und Röntgenstrahlen erkannt werden.

Die Kombination von 0.5 mg/kg VDS und 0.9 Gy bewirkte hingegen keinen signifikanten Anstieg der Strahlenreaktion. Die Missbildungsfrequenz war mit 17.7 % sogar deutlich tiefer als nach Vorbehandlung mit den beiden niedrigen Vindesin-Konzentrationen, was in erster Linie auf den nur *sub-additiven* Reaktionsmodus zwischen den verwendeten Agenzien zurückzuführen ist. In qualitativer Hinsicht besonders interessant ist hingegen eine, nur spezifisch in dieser Versuchsgruppe auftretende, Missbildungsart, die von uns als "*Mops Gesicht*" bezeichnet wurde. Dabei handelt es sich um eine Verkürzung des Oberkiefers bei gleichzeitiger Vorschiebung des Unterkiefers (Prognathie). Alle solchenart missgestaltete Feten (4) hatten zudem Hirndefekte und Augenschäden (Anophthalmie und Mikrophthalmie). Bei einem Tier gesellte sich zusätzlich auch noch Wolfsrachen dazu. Uebrige Anomalien wie Hypognathie, Wolfsrachen, Polydaktylie, Kyphose und Nieren-Hypoplasie blieben in der Zahl ebenfalls unterhalb der Signifikanzebene. Alle diese Befunde zeigen, dass in Bezug auf teratogene Effekte die strahlensensibilisierende Eigenschaft des Alkaloids auf die beiden nicht-embryoletalen Dosierungen beschränkt bleibt.

Die sehr hohe Missbildungsrate (46.2 %) nach Kombinationsbehandlung mit 1.0 mg/kg VDS und 0.9 Gy kann an Betracht der geringen Zahl überlebender Feten (13) statistisch ebenfalls nicht gesichert werden. Die 6 betroffenen Nachkommen wiesen allesamt schwere Kopfanomalien

(Himbruch und Hydrozephalus) auf, meist kombiniert mit Augenstörungen wie Exo- oder Mikrophthalmie (4 Tiere).

Es wurde bereits angedeutet, dass sich die Schädigungspotenz einer Noxe auch in der Fähigkeit, am demselben Tier mehrere Anomalien gleichzeitig zu induzieren, niederschlägt. Tabelle 9 gibt Auskunft über die Inzidenz von Einzel- oder Mehrfachmissbildungen nach der Behandlung am Tag 8 der Gestation. Dabei wird ersichtlich, dass Vindesin in separater Verabreichung nur einfache Anomalien zu produzieren vermag, während Röntgenstrahlen auch kombinierte Abnormitäten (wie z.B. die meist zusammen mit Hirndefekten auftretenden Augenmissbildungen) hervorrufen können. Die Steigerung der Strahlenwirkung durch die beiden niedrigen Konzentrationen des Zytostatikums drückt sich auch in der Verdoppelung der Häufigkeit von Mehrfachschäden gegenüber der bestrahlten Referenzgruppe aus.

Es ist erwähnenswert, dass nach einer Vorbehandlung mit 0.35 mg/kg VDS die Einzelanomalien deutlich zahlreicher waren als Mehrfachschäden, während nach einer Kombination von 0.25 resp. 0.5 mg/kg VDS und Strahlen die beiden Teratogenitätsformen gleich häufig auftraten. Einzig nach einer Bestrahlung der mit 1.0 mg/kg Vindesin injizierten Tiere war der Prozentsatz von Einzelschäden nur halb so hoch wie dergenen von kombinierten Fetopathien.

Was das Geschlechtsverhältnis bei missgebildeten Mausfeten anbelangt (Tabelle 8), so ergeben sich längst nicht so klare Trends wie am Tag 9. Weder die Einzelapplikation von Vindesin noch diejenige von Röntgenstrahlen bedingte signifikante Sensibilitätsunterschiede zwischen den beiden Geschlechtern. Während nach Strahlenexposition der Prozentsatz geschädigter Weibchen immerhin um 10 % höher war als derjenige der Männchen (18.6 bzw. 8.5 %), scheint nach Abgabe von VDS allein die Empfindlichkeitsrichtung von der Dosierung des Chemikaliiums abhängig zu sein. So werden nach Verabreichung niedriger VDS-Konzentrationen häufiger die weiblichen, nach Injektion höherer Dosen hingegen eher die männlichen Feten morphogenetisch geschädigt. Nach einer kombinierten Applikation von 0.25 oder 0.5 mg/kg VDS und Bestrahlung wurden Organmissbildungen öfters bei den weiblichen als männlichen Implantaten beobachtet, der Unterschied ist für die 0.25 mg/kg VDS + 0.9 Gy-Gruppe statistisch signifikant ($p < 0.05$). Interessanterweise liegen die Verhältnisse nach Vorbehandlung mit 1.0 mg/kg VDS gerade umgekehrt, wobei diese Empfindlichkeitsänderung an einer grösseren Population verifiziert werden müsste.

Zusammenfassend ergab die Studie, dass in bezug auf teratogene Effekte die strahlensensibilisierende Eigenschaft des Alkaloids grundsätzlich von zwei Faktoren abhängig ist, nämlich: a) von

der abgegebenen Konzentration der Substanz, und b) vom Applikationszeitpunkt. So verstärkt das Zytostatikum die Strahlenreaktion nur dann synergistisch, wenn es im niedrigen Dosierungsbereich (0.25 und 0.35 mg/kg) und am Tag 8 der Gestation verabreicht wird. Demgegenüber führt die Kombinationsbehandlung mit 0.5 mg/kg VDS + 0.9 Gy am Tag 9 zu einer Addition der Einzeleffekte, während am Tag 8 lediglich ein antagonistischer Interaktionsmodus resultiert. Ebenfalls als stadiumspezifisch erwies sich das Missbildungsmuster. Abnormitätsformen wie Hydrozephalie, Anophthalmie, Mikro- und Anotie, Hypognathie, Prognathie, Gnathoschisis oder Nieren-Hypoplasie konnten nur am Tag 8 post conceptionem induziert werden, während Hypodaktylie als eine typische Vindesin-bedingte Missbildungsart auf das ältere Entwicklungsstadium beschränkt blieb. Allgemein betrachtet reagiert das Embryonalgewebe während der früheren Organogenese deutlich empfindlicher auf die ionisierende Strahlung allein oder zusammen mit kleinen Vindesin-Dosen als zum späteren Zeitpunkt.

1.2.5 Gesamtschädigung

Applikation von Vindesin allein.

Am besten kann die embryotoxische Potenz der vier verschiedenen Vindesin-Konzentrationen anhand der Dosis-Wirkung-Kurve (Abb. 6) veranschaulicht werden. Auffallend dabei ist die geringere Empfindlichkeit des jüngeren Embryonalstadiums auf Vindesin verglichen mit jener am Tag 9 der Gestation. Im Bereiche der beiden niedrigen Dosierungen des Alkaloids verläuft die Kurve äusserst flach und weist erst von der Konzentration von 0.5 mg/kg an einen steilen Anstieg der Schädigungsfrequenz auf. Die starke Toxizitätswirkung der letztgenannten Dosis (mehr als die Hälfte aller Implantate tot oder abnorm) deutet darauf hin, dass der Schwellenwert für VDS-induzierte Pränatalschäden am Tag 8 zwischen 0.35 und 0.5 mg/kg zu suchen ist.

Nach Verabreichung von 1.0 mg/kg Vindesin vermehrte sich die Schädigungsfrequenz gegenüber der nächst-tieferen Dosierungsgruppe lediglich um weitere 13.6 % (siehe Tabelle 6), was vor allem auf die fehlende teratogene Aktivität der höchsten Vindesin-Konzentration zurückzuführen ist. Verglichen mit Tag 9 verringert sich die embryotoxische Wirksamkeit des Onkolytikums um 9 bzw. 24 % im niedrigen und um 32 resp. 35 % im höheren Dosierungsbereich (vergleiche Tabellen 2 und 6). Die Empfindlichkeitsdifferenzen zwischen den beiden Behandlungsstadien können für die 0.35 und 0.5 mg/kg-Gruppen mit $p < 0.002$ sogar statistisch gesichert werden.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Die Gesamtschädigungsfrequenz nach Exposition mit 0.9 Gy Röntgenstrahlen beträgt mit 25.2 % zwar das Doppelte des Kontrollwertes, in den einzelnen Würfen ist sie jedoch grossen Schwankungen unterworfen. Auf grund dieser Variationsbreite ist die Differenz zur unbestrahlten Gruppe nicht signifikant. Auch unterscheiden sich die beiden Entwicklungsstadien in bezug auf die Gesamttoxizität der applizierten Dosis viel weniger voneinander als dies hinsichtlich der nicht-letal (und insbesondere teratogenen) Strahlenwirkungen beobachtet worden ist.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Anders als nach Bestrahlung allein ist der Sensibilitätsanstieg des weniger differenzierten Embryonalgewebes auf die Kombinationsbehandlung mit den beiden niedrigen Vindesin-Dosen (0.25 und 0.35 mg/kg) und Strahlen gegenüber Tag 9 statistisch signifikant. Dabei wird durch die Vorbehandlung mit 0.25 mg/kg VDS der Strahlenschaden um einen Faktor von 1.7, mit 0.35 mg/kg VDS hingegen bereits um einen Faktor von 2.3 angehoben. Der Kombinationseffekt von 41.8 % nach 0.25 mg/kg VDS + 0.9 Gy entspricht einer *Summation* der Einzelwirkungen (Interaktionsindex von 1.06), während die Bestrahlung der mit 0.35 mg/kg Vindesin behandelten Tiere eine *synergistische* Reaktionsverstärkung (Schädigungsrate liegt 14.4 % über der Additivitätsebene) hervorruft.

Wie aus der Abbildung 6 ersichtlich wird, entsprechen sich die nach einer einfachen oder kombinierten Anwendung von 0.5 mg/kg VDS erhaltenen Toxizitätswerte weitgehend. Demgegenüber deutet die maximale Gesamtschädigungsrate von 96.8 % nach 1.0 mg/kg VDS + 0.9 Gy auf eine Addition der Einzelwirkungen der beiden Agenzien hin.

2. Die histologische Analyse der Augenanlagen

2.1 Mitoseaktivität

2.1.1 Untersuchungen 4 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Durchschnittlich findet man pro Schnitt 16.6 Mitosefiguren, bei einem Total von ungefähr 110 Zellen (Tabelle 11). Die Proliferationsaktivität der Neuroblasten ist dabei je nach Augenregion recht unterschiedlich. Die höchste Mitoserate wurde im ventralen Abschnitt mit 54 % aller sich teilenden Zellen (9 Mitosen pro Schnitt) registriert. Die zweithöchste Zellteilungsinzidenz weist die distale Augenregion mit einem Anteil an Proliferationsstadien von 23 % auf. Deutlich geringere Vermehrungsfrequenzen der zukünftigen Neuralelemente zeigen dagegen die dorsale Zone (16 %) und das Linsenepithel (7 %).

Applikation von Vindesin allein.

Gesamthaft war die Reproduktionsrate der Neuroblasten nach Zugabe von VDS um ca. 15 % geringer als diejenige der Kontrolle (14.2 Mitosen/Schnitt). Die Differenz ist mit $p < 0.005$ statistisch gesichert. Signifikant herabgesetzt war dabei die Häufigkeit von Zellen im Stadium der Prophase und der Ana/Telophase, während der Anteil an Metaphasen durch die Behandlung unverändert blieb (Tabelle 12).

Was die einzelnen Auswertungsbereiche anbelangt, so betraf die Reduktion der Zellteilung nur den ventralen und distalen Augenbereich, wobei das Chemikaliu die spontane Mitoserate um 16 bzw. 34 % herabsetzte ($p < 0.005$).

Während jedoch im ventralen Abschnitt, wie auch in der gesamten Anlage, einzig das Auftreten von Prophasen und vor allem der Ana- und Telophasen unterdrückt wurde, sind an der verstärkten Mitosereduktion im Distalbereich alle drei Teilungsstadien beteiligt.

Somit scheint Vindesin 4 Stunden nach Behandlung hauptsächlich auf die Prophase (Frühmitose) sowie auf die Spätmitosen (Ana- und Telophasen) einzuwirken.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Die Röntgenbestrahlung reduzierte die Zellvermehrung stärker als Vindesin. Im Vergleich zur Kontrolle war die Proliferationsaktivität der Neuroblasten um 34 % geringer (11

Mitosen/Schnitt). Dabei sind die Häufigkeiten aller drei Teilungsstadien signifikant herabgesetzt worden (siehe Tabelle 12).

Ähnlich wie nach VDS-Zugabe erwiesen sich die ventralen und distalen Augenpartien als die empfindlichsten bezüglich Zellteilungsstörungen. Die ausgeprägteste Mitosehemmung fand in der Ventralzone statt, wo ein Absinken des Durchschnittswerts von 9 auf 4.8 Mitosen pro Schnitt auftrat (Tabelle 11).

Eine weniger starke Abnahme der Proliferationsrate, nämlich um 26 %, betraf den distalen Bereich. Auch hier ist der Unterschied zur Kontrolle statistisch signifikant. Wie schon am gesamten Primordium festgestellt wurde, zeigten ebenfalls die beiden erwähnten Auswertungsbereiche, dass die Inzidenz aller untersuchten Mitosestadien durch die Einwirkung ionisierender Strahlen verringert wird.

Zusammenfassend demonstrieren somit diese Daten, dass hinsichtlich der Inzidenz einzelner Mitosefiguren keine selektive Strahlenwirkung vorliegt. Mitentscheidend an dem verstärkten antimitotischen Effekt in dieser Gruppe ist neben der erhöhten Abnahme von Prophasen und Ana/Telophasen vor allem diejenige der Metaphasen.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Der nach einer kombinierten Applikation von VDS und Bestrahlung erhaltene Durchschnittswert von 11.9 Mitosen/Schnitt für die gesamte Anlage deutet darauf hin, dass die Vorbehandlung mit dem Zytostatikum zu keiner zusätzlichen Modifikation der antimitotischen Wirkung führte. Die Zellteilungsfrequenz entspricht vielmehr jener des strahlenexponierten Primordialgewebes. Die Analyse der Häufigkeiten einzelner Mitosestadien (Tabelle 12) zeigt, dass die leichte Erhöhung der Proliferationsaktivität gegenüber der bestrahlten Referenzgruppe auf einer signifikanten Vermehrung der Metaphasen-Figuren beruhen dürfte.

Auch die einzelnen Augenregionen zeigen keine verstärkte Verminderung der Proliferationsrate im Vergleich zu nur bestrahlten Anlagen. Obwohl, mit Ausnahme der Dorsalregion, alle Zonen eine signifikante Abnahme der spontanen Teilungsinzidenz aufweisen, liegt die Kombinationswirkung nur in der Grössenordnung der strahlenexponierten Gruppe (Tabelle 11).

Es ist bemerkenswert, dass sich die Zahl der Mitosen in der ventralen Augenpartie durch die vorangehende Zugabe von Vindesin sogar von 4.8 auf 6.0 signifikant erhöhte (Tabelle 11). Dabei ist der Metaphasen-Anteil um 48 % höher als in der bestrahlten Vergleichszone ($p <$

0.005).

Dass die Metaphasen-Frequenz nach kombinierter Behandlung weniger absinkt als nach alleiniger Bestrahlung, ist wohl auf den Einfluss des Alkaloids zurückzuführen. Trotz einer solchen "Schutzwirkung" des Vindesins sollte jedoch vermerkt werden, dass der Metaphasen-Effekt des Zytostatikums zusammen mit Bestrahlung eher abgeschwächt wird. Abgesehen von der distalen Augenregion sind die Metaphasen-Frequenzen gegenüber VDS allein sogar signifikant herabgesetzt (gesamte Anlage, ventrale Zone, Linsenplakode). Die Häufigkeiten der Prophasen und der Ana/Telophasen unterscheiden sich nicht signifikant von denjenigen der bestrahlten Anlagen (Tabelle 12).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass das Zytostatikum in alleiniger Verabreichung zwar antimitotisch wirksam ist, im Kombinationsversuch jedoch keinen zusätzlichen Beitrag zur Modifikation der strahlenbedingten Proliferationshemmung liefert.

2.1.2 Untersuchungen 12 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Das spätere Augenprimordium weist gegenüber dem 4 Stunden-Intervall mit durchschnittlich 25.6 Mitosen/Schnitt eine Zunahme der Zellteilungsaktivität um 54 % auf (Tabelle 13).

Der Proliferationsstatus einzelner Augenregionen kann am besten anhand eines Vergleichs der für die beiden Kontrollgruppen ermittelten Werte (Tabellen 11 und 13) beurteilt werden. So wird ersichtlich, dass sich innerhalb von 8 Stunden die Reproduktionsrate der Neuroblasten im Retinalbereich verdoppelte, in den Abschnitten der Linse und des Augenpigments um einen Faktor von 1.8 bzw. 1.6 zunahm, während im Augienstiel der Unterschied geringer ausfällt.

Die Verteilung der proliferierenden Neuroblasten innerhalb der Anlage zeigt, dass im Vergleich zum 4 Stunden-Intervall im Augienstiel die Mitoseaktivität um 10 % abnimmt und diejenige in der Retina um 7 % zunimmt. Die Zellteilungsinzidenzen in der Pigmentzone (17 %) und Linse (9 %) liegen im Bereiche der früheren Befunde.

Applikation von Vindesin allein.

Die mittlere Proliferationsrate in der gesamten Anlage war gegenüber der Kontrolle um 16 % herabgesetzt ($p < 0.005$). Signifikant vermindert wurden dabei die absoluten Häufigkeiten von

Prophasen (- 25 %) und von Ana/Telophasen (- 13 %). Somit liegt der antimitotische Effekt des Chemikaliums im Rahmen desjenigen 4 Stunden nach Applikation. Bereits vorher beschrieben wurde auch der selektive Einfluss des Vindesins auf die Früh- und Spätmitosen (Tabelle 14).

Die Hemmung der zellulären Reproduktionsfrequenz durch das Zytostatikum konnte für *alle* Auswertungszonen statistisch gesichert werden. Im Augenziel setzte VDS die spontane Mitoserate nur um ca. 12 % herab, was die kleinste Proliferationsabnahme innerhalb des Primordiums bedeutet. Die geringere Suppressionswirkung des Alkaloids in der erwähnten Region kommt dadurch zustande, dass die Inzidenzen der Prophasen und Ana/Telophasen zwar signifikant gesenkt werden, die absolute Häufigkeit von Metaphasen jedoch gleichzeitig signifikant anwächst.

Auch innerhalb der Retina ist das Ausmass an Mitosereduktion (16 %) geringer ausgefallen als 4 Stunden nach Behandlung (34 %). Dabei wurde einzig die absolute Frequenz von Prophasen signifikant herabgesetzt (29 % weniger als bei Kontrolle). Erstmals hingegen wurden auch die Bereiche des Pigmentepithels und der Linsenplakode betroffen. Mit einer Abnahme der Zellteilungsrate um 18 resp. 27 % gegenüber der Referenzgruppe war die Wirkung des Alkaloids somit ausgeprägter als in den vorher erwähnten Augenpartien. Während die Mitosesenkung bei der Pigmentzone in erster Linie auf eine signifikante Verminderung der Prophasenfrequenz (um 16 %) zurückgeht, weist die Linse vor allem eine besonders starke Abnahme der Häufigkeit von Ana- und Telophasen auf (33 % weniger als Kontrolle, $p < 0.05$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Antiproliferationswirkung des Vindesins auf die Retinalneuroblasten mit fortschreitender Zeitispanne seit Applikation abgeschwächt wird. Andererseits macht sich in den bisher verschonten Augenpartien (Pigmentzone und Linse) die zellteilungshemmende Potenz des Alkaloids bemerkbar.

Was die absolute Häufigkeit der einzelnen Mitosestadien anbelangt, so zeigte auch die Untersuchung 12 Stunden nach Verabreichung einen selektiven Suppressionseffekt des Zytostatikums auf die Frühmitosen (Prophasen) und Spätmitosen (Ana/Telophasen).

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Zwölf Stunden nach Strahlenexposition war die spontane Proliferationsrate der Neuroblasten gesamthaft nur noch um 12 % herabgesetzt (Mitoschemmung nach 4 h: 34 %). Signifikant

vermindert waren neben der Häufigkeit von Ana/Telophasen (- 8 %) vor allem diejenige der Prophasen (- 19 %).

Die Tendenz des Primordialgewebes zum Aufholen der früh nach Bestrahlung gesetzten Mitoseverluste zeigen auch die einzelnen Evaluationszonen. So verringert sich der Rückstand an Reproduktionsinzidenz der Neuroblasten im Gebiet des Augenstiels gegenüber der Kontrolle auf 18 % (4 Stunden: noch 47 % !), während im Retinalabschnitt die mitotische Aktivität bereits Normalwerte erreicht hat (siehe Tabelle 13). Neben dem Augenstiel zeigte die Pigmentzone ebenfalls eine statistisch signifikante Abnahme der Zellteilungsfrequenz, jedoch in nur geringer Ausprägung (9 %).

Es ist interessant, dass Röntgenstrahlen die absoluten Häufigkeiten der Teilungsstadien ähnlich beeinflussen wie das Vindesin. Waren 4 Stunden nach Exposition noch die Inzidenzen aller drei Mitosephasen herabgesetzt, so wurde 8 Stunden später der Anteil an Neuroblasten im Metaphase-Stadium nicht reduziert. Betroffen waren vor allem die Prophasen, deren Frequenz in den meisten Augenpartien signifikant gesenkt worden ist (siehe Tabelle 14).

Der stärkste antimitotische Strahleneffekt innerhalb des Augenstiels wird anscheinend durch eine signifikante Unterdrückung des Auftretens von Prophasen (- 26 %) sowie von Ana/Telophasen (-17 %) hervorgerufen.

Die für das Kriterium Mitoseaktivität erhaltenen Werte widerspiegeln somit das Bestreben des embryonalen Organismus, die normale Proliferationskapazität des Augengewebes wieder herzustellen. So wurde innerhalb von 8 Stunden der zelluläre Reproduktionsverlust im Augenstiel von 47 auf 18 % verringert und im Retinalabschnitt sogar auf Kontrollebene gebracht. Die durchschnittlichen Häufigkeiten der drei Teilungsstadien zeigen ähnliche Tendenzen an wie in der VDS-Gruppe. Die Suppression der Vermehrungsrate wird in erster Linie bedingt durch eine selektive Strahlenwirkung auf frühmitotische Zellen (G_2 -Block) und stellenweise (Augenstiel) auch auf Spätmitosen (Ana/Telophasen).

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die kombinierte Anwendung der beiden Agenzien führte statt einer vermehrten antimitotischen Wirkung gegenüber alleiniger Behandlung sogar zur *gesteigerten* Proliferationsaktivität der Neuroblasten. So war die durchschnittliche Anzahl Mitosen pro Schnitt in der gesamten Augenanlage und auch im Augenstiel signifikant *höher* als in der nur bestrahlten Gruppe (siehe Tabelle

13). Die gleiche Beobachtung wurde bereits 4 Stunden nach Exposition gemacht. Waren jedoch beim früheren Untersuchungsintervall die Zellteilungsraten immer noch tiefer als bei den "Kontrollaugen", so stimmen die 12 Stunden nach Kombinationsbehandlung ermittelten Werte mit jenen der unbehandelten Anlagen weitgehend überein. Es macht somit den Eindruck als ob durch die Wechselwirkung beider Noxen die zelluläre Reproduktionsrate einen verstärkenden Impuls erhalten hätte.

Was die absoluten Häufigkeiten der drei Teilungsphasen anbelangt (Tabelle 14), so wird ersichtlich, dass die nach Einzelbehandlung herabgesetzten Inzidenzen von Ana- und Telophasen im gesamten Primordium und Augentiel wieder im Kontrollbereich liegen. Die Zahl der Prophasen war gegenüber den unbehandelten Anlagen zwar noch teilweise signifikant erniedrigt (gesamte Augenblase, Retina und Pigment), jedoch in biologisch unbedeutendem Ausmasse.

Somit wirken im kombinierten Versuch die Röntgenstrahlen und VDS bezüglich des Kriteriums Mitose in eindeutig *positiver* Richtung zusammen, indem die Proliferationspotenz präsumptiver Neuralzellen normalisiert wird.

2.1.3 Untersuchungen 24 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Es hat sich gezeigt, dass mit fortschreitender Augendifferenzierung die Vermehrungsaktivität der Neuroblasten generell weniger anwächst als dies beim Vergleich der beiden jüngeren Entwicklungsstadien registriert wurde. So ist die Proliferationsrate mit durchschnittlich 34 Mitosen pro Schnitt nur noch um 33 % höher als 12 Stunden zuvor (Vergleich 12 und 4 Stunden-Intervall: Zunahme um 54 %).

Die in den einzelnen Auswertungsbereichen gefundenen Werte charakterisieren das morphogenetische Aktivitätsmuster der verschiedenen Augenstrukturen. Es scheint, dass weniger die Gewebsmasse und Ausdehnung einer bestimmten Region die Zellteilungshäufigkeit bestimmen, als eher die Umwandlungsprozesse innerhalb derselben.

So zeichnet sich beispielsweise die Pigmentzone durch eine deutlich grössere Ausdehnung aus als die zukünftige Linse, weist jedoch gegenüber dem früheren Entwicklungsstadium eine Abnahme der Mitoseaktivität um 38 % auf. Die Umwandlung der Linsenplakode in Linsenbecher, die recht komplizierte Involutionvorgänge mit sich bringt, bedingte hingegen eine Verdoppelung zellulärer Reproduktionsrate (Vergleiche Tabellen 13 und 15). Auch im

Augenstiel, dessen Gewebe 12 Stunden zuvor den geringsten Mitosezuwachs aller Augennanschnitte verzeichnete, erfolgte ein Proliferationsanstieg um einen Faktor von 1.5. Obgleich die präsumptive Retina im Verlaufe von 12 Stunden nebst einer grösseren Ausdehnung in dorsaler und ventraler Richtung auch eine zusätzliche Verdickung proximalwärts (Augenbecher) erfahren hat, ist die Zellteilungsrate nur um 20 % höher als in der weniger differenzierten Referenzzone.

Innerhalb des Primordiums verteilt sich die embryonale Proliferationsaktivität wie folgt auf die einzelnen Regionen: Augenstiel 51 %, Retina 28 %, Augenpigment 8 % und Linsengrube 13 % der gesamten Mitoserate. Somit wird auch hier ersichtlich, dass, anders als bei den früheren Entwicklungsstadien, die morphogenetische Aktivität der Linse diejenige der Dorsalregion überwiegt. Im Vergleich zum 12 Stunden-Intervall liegt die relative Zellvermehrungsrate im Augenstiel und Linse um 7 bzw. 4 % höher, diejenige des Pigmentepithels dagegen um 9 % tiefer. Die zelluläre Multiplikationskapazität der Retina blieb etwa im Rahmen jener 12 Stunden zuvor.

Applikation von Vindesin allein.

Die proliferationshemmende Kapazität des Alkaloids wird mit zunehmender Zeit nach Verabreichung immer mehr abgeschwächt. Gesamthaft wurde durch Vindesin die spontane Zellteilungsrate nur noch um 8 % vermindert ($p < 0.005$), das Ausmass an Mitosereduktion ist damit lediglich halb so gross wie 12 Stunden zuvor. Betroffen wurden dabei die Stadien der Prophase sowie der Ana- und Telophase, deren absolute Häufigkeit um 13 bzw. 9 % herabgesetzt wurde. Somit bleibt die selektive Wirkung der Substanz auf die Früh- und Spätmitosen (wie 4 und 12 Stunden nach Applikation) erhalten, nur der Suppressionsgrad vermindert sich.

Auch in den einzelnen Augenregionen zeigt sich eine Tendenz zur Normalisierung der zellulären Erneuerungsfrequenz. So erfolgte eine statistisch signifikante Abnahme der Proliferationsrate gegenüber der Kontrolle nur noch innerhalb des Augenstiels und der Retina (12 Stunden vorher auch in den restlichen Partien). Ein Vergleich der Antimitosepotenzen des Chemikaliums zum früheren und jetzigen Zeitpunkt zeigt, dass im ventralen Augenabschnitt die Suppressionswirkung von 12 auf 7 % reduziert wird, im Retinalabschnitt hingegen mit 14 % fast gleich hoch bleibt wie 12 Stunden nach Zugabe (16%). Somit wird die Zellvermehrung innerhalb der präsumptiven Netzhaut durch VDS viel stärker beeinträchtigt als in der erstgenannten Region.

Die in Tabelle 16 angegebenen absoluten Häufigkeitsanteile der untersuchten Mitosestadien widerspiegeln die selektive Wirkung des Alkaloids einzig auf das Auftreten von Prophasen, und zwar nur innerhalb des Augenstiels und der Retina. Damit geht 24 Stunden nach Behandlung sowohl der früher bemerkte Metaphasen-Block des Zytostatikums (im Augenstiel) wie auch dessen Einfluss auf die Spätmitosen (Ana/Telophasen) verloren. Zu vermerken ist, dass die Zahl der Prophasen in den beiden oben erwähnten Regionen nur um 14 resp. 19 % kleiner ist als bei der unbehandelten Gruppe (12 Stunden-Intervall: Differenz zur Kontrolle betrug noch 25 bzw. 29 %).

Zusammenfassend zeigte die histologische Studie, dass die antimitotische Wirkung des Chemikali-ums zwar auch 24 Stunden nach Applikation erhalten bleibt, eine Tendenz des primordialen Augengewebes zur Wiederherstellung normaler Zellteilungsaktivität jedoch nicht zu übersehen ist.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Der Gesamtdurchschnitt von 33.5 Mitosen pro Schnitt liegt zwar ein wenig unterhalb des Kontrollbereiches, der Unterschied ist jedoch nicht mehr statistisch signifikant. Das Gleiche gilt auch für die beiden Regionen Augenstiel und Retina, während in der Pigmentzone und Linsengrube die Strahlenexposition die spontane Zellteilungsfrequenz sogar leicht erhöhte (Tabelle 15). Diese Ergebnisse sind insofern nicht überraschend, als sich bereits 12 Stunden nach Behandlung die Tendenz zum Aufholen des Proliferationsrückstandes andeutete.

Werden die aus den drei Untersuchungsintervallen gewonnenen Daten zusammengefasst, so ergeben sich folgende Erkenntnisse: von allen Augenpartien reagieren die Neuroblasten des *Augenstiels* am empfindlichsten hinsichtlich strahlenbedingter Mitosehemmung. Der 4 Stunden nach Exposition gesetzte Schaden war hier am grössten (47 %) und erreichte erst 20 Stunden später die Kontrollebene. Die Beeinträchtigung der Zellteilung im Retinalbereich ist bereits sichtlich geringer ausgefallen (20 %) und dementsprechend schon nach weiteren 8 Stunden behoben worden. Die dorsale Augenblase (Pigment) wies gerade zum letztgenannten Zeitpunkt eine biologisch unbedeutende Proliferationssenkung auf, während die Vermehrung zukünftiger Linsenzellen im Verlaufe der gesamten Untersuchungsperiode ungestört verlief.

Obwohl die *totalen* Anteile an proliferierenden Zellen innerhalb der Auswertungszonen nicht signifikant von jenen der unbestrahlten Referenzgruppe differieren, bestehen Unterschiede

betreffend der *absoluten* Frequenzen einzelner Mitosestadien (Tabelle 16). Charakteristisch für das untersuchte Entwicklungsstadium ist der signifikante Anstieg des Metaphasenanteils in allen Regionen ausser der Retina, gekoppelt mit einer ebenfalls signifikanten Abnahme der Prophasenrate (Ausnahmen: Pigmentzone und Linsengrube). Dass die Vermehrungsaktivität zukünftiger Neuralzellen durch solche Verschiebungen von Einzelfrequenzen nicht nachteilig beeinflusst wird, liegt an der starken Vermehrung der Zellen in der Metaphase zusammen. Dadurch können die Verluste an frühmitotischen Teilungsstadien ausgeglichen werden.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die Kombinationsbehandlung führte zu völlig unerwarteten Ergebnissen. Nachdem noch 12 Stunden zuvor die beiden Agenzien eine *positive* Wechselwirkung aufwiesen, indem sie eine Normalisierung der Zellteilungsaktivität herbeiführten, macht sich ein halber Tag später eine gegenteilige Tendenz bemerkbar. Wie aus der Tabelle 15 hervorgeht, wurde die antimitotische Wirkung des Vindesins durch die nachfolgende Bestrahlung stark erhöht. In den gleichen Regionen (Gesamte Anlage, Augensiel und Retina) wie nach separater Verabreichung des Chemikaliums wurde die spontane Proliferationsfrequenz nicht nur signifikant, sondern auch im *verstärkten* Masse herabgesetzt.

Mit durchschnittlich 28.5 Mitosen pro gesamte Anlage betrug die Differenz zur Kontrolle ca. 17 % und war somit doppelt so gross wie nach einfacher Zugabe von Vindesin. Noch stärker wurde die proliferationshemmende Eigenschaft des Alkaloids im Bereiche des Augensiels potenziert. Der Unterschied zur unbehandelten Gruppe beträgt hier 22 %, während Vindesin allein die Häufigkeit der Mitosen lediglich um 7 % verminderte. Auch die Vermehrungsrate von Retinalneuroblasten wurde durch die Kombinationsbehandlung gegenüber Kontrolle um etwa gleichen Betrag, nämlich 23 % erniedrigt (VDS allein: 14 %).

Abgesehen davon, dass es unklar ist, ob die Röntgenstrahlen einen sensibilisierenden Einfluss auf die antimitotische Wirkung der Substanz ausüben oder ob umgekehrt Vindesin die Strahlenwirkung fördert, ist die *synergistische* Wechselbeziehung zwischen den beiden Noxen offensichtlich. Zudem verdeutlichen diese Befunde, dass 24 Stunden nach Behandlung in bezug auf das Kriterium "Mitoseaktivität" zwar eine scheinbare Erholung möglich ist, diese jedoch von einer *neuen Welle* reduzierter Zellteilungskapazität abgelöst werden kann. Die Art der Wechselwirkungen zwischen den applizierten Agenzien unterzieht sich somit je nach Untersuchungsintervall grundlegenden Veränderungen.

Detailliertere Informationen über die Ursachen der verstärkten Mitoseunterdrückung im Kombinationsversuch liefert die Häufigkeitsanalyse einzelner Teilungsstadien (Tabelle 16).

Nach Kombinationsbehandlung mit Vindesin und Röntgenstrahlen waren die durchschnittlichen Frequenzen aller drei Mitosestadien signifikant kleiner als in der bestrahlten Gruppe. Die ermittelten Daten zeigen, dass die erhöhte Hemmung spontaner Zellteilungsaktivität nach gemeinsamer Anwendung beider Noxen mit einer stärkeren Reduktion der Zahl von Früh- und Spätmitosen (um 28 bzw. 18 %) als nach Einzelapplikation erklärbar ist. Zugleich wird durch die Vorbehandlung mit Vindesin die strahlenbedingte Metaphasen-Vermehrung herabgesetzt.

Uebereinstimmende Befunde ergaben sich auch für den Bereich des Augenstiels. Die absoluten Frequenzen der Prophasen und Ana/Telophasen lagen sichtlich tiefer als nach alleiniger Verabreichung der beiden Agenzien, und das Absinken des Metaphasenteils gegenüber der bestrahlten Referenzgruppe erreichte ebenfalls ein statistisch signifikantes Ausmass. Ein Vergleich mit der Kontrolle zeigt, dass die Suppression der Zellteilung vor allem auf eine signifikante Häufigkeitsabnahme von Frühmitosen (- 34 %), gefolgt von jener der Spätmitosen (- 22 %) zurückgeht.

Aehnliches zeigte sich auch für die zweite Region mit signifikanter Proliferationshemmung, nämlich die zukünftige Netzhaut. Die Reduktion der spontanen Vermehrungsfrequenz basiert auf einer starken Abnahme der Anteile an Prophasen (- 32 %) und an Ana/Telophasen (- 27 %). Diese Unterschiede zur Kontrolle sind statistisch hochsignifikant ($p < 0.005$). Anders als im ventralen Augenabschnitt war die Abnahme der Metaphasenrate gegenüber der bestrahlten Gruppe statistisch nicht signifikant. Während ein Absinken der Prophasenhäufigkeit, nur weniger ausgeprägt, bereits im Einzelversuch registriert worden ist, erfolgte die Unterdrückung des Auftretens spätmitotischer Teilungsstadien einzig im Kombinationversuch.

2.2 Verteilungsmuster der einzelnen Mitosestadien

2.2.1 Untersuchungen 4 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Unter dem mitotischen Verteilungsmuster versteht man die *prozentualen* Anteile der Prophasen, Metaphasen und Ana/Telophasen an der Gesamtzahl gezählter Mitosen (Tabelle 17). Dieses Kriterium drückt somit die *relativen* Werte aus, im Gegensatz zu den absoluten Zahlen, welche die durchschnittlichen Häufigkeiten der drei Teilungsphasen pro Schnitt wiedergeben. Nach

Applikation einer Noxe kann eine verminderte Zellvermehrungsrate auf die Reduktion der absoluten Frequenzen einzelner Mitosestadien zurückgehen, während das relative Verteilungsmuster nicht beeinträchtigt wird. Andererseits liefert das mitotische Verteilungsspektrum bei induzierter Veränderung (z.B. Metaphasen-Anhäufung) wichtige Hinweise betreffend zellkinetischer Ursachen der Proliferationshemmung.

Die Verteilung der einzelnen Mitosephasen verläuft folgendermassen: in der gesamten Augenanlage nehmen die Prophasen mit 45 % Häufigkeit den grössten Anteil am Total gezählter Mitosen ein, während die Metaphasen (27 %) und die Ana/Telophasen (28 %) bereits deutlich geringere Inzidenzen aufweisen.

Auch in den verschiedenen Augenzonen erhält man ein ähnliches Verteilungsmuster, einzig dass in der distalen Augenblase die Zahl der Prophasen (50 %) und in der Linsenplakode diejenige der Metaphasen (35 %) auf Kosten der Ana- und Telophasen leicht anstieg.

Applikation von Vindesin allein.

Nach den üblichen Vorstellungen bewirkt Vindesin eine Arretierung der Zellteilung auf der Metaphasen-Ebene (Spindelgift-Effekt). Die Analyse der prozentualen Anteile einzelner Mitosephasen zu bestimmten Zeiten nach Applikation könnte also zum besseren Verständnis der Schädigungsmechanismen des Alkaloids beitragen.

In der gesamten Anlage hat VDS die Zahl der Metaphasen gegenüber der Kontrolle um ca. 5 % erhöht ($p < 0.005$), während sich der Prozentsatz an Ana/Telophasen signifikant verminderte (Tabelle 17). Somit würde bereits auch ein eher geringer Metaphasenblock ausreichen, um die Proliferationsaktivität des Augengewebes um 15 % herabzusetzen.

Zu erwähnen ist, dass 4 Stunden nach Behandlung der Zuwachs an Metaphasen in den einzelnen Augenregionen die 7 %-Grenze nie überschreitet und nur in der Linsenplakode gegenüber der Kontrolle statistisch gesichert ist ($p < 0.005$). Die parallel dazu verlaufende Abnahme des Anteils an Ana- oder Telophasen ist hingegen (mit Ausnahme der Ventralregion) in allen Augenpartien statistisch gesichert (Tabelle 17). Obwohl also die Spindelgift-Wirkung von 0.35 mg/kg Vindesin nicht besonders ausgeprägt ist, wird der Uebergang Metaphase - Anaphase dennoch in dem meisten Auswertungsbereichen in signifikantem Masse blockiert. Dieser Befund erklärt zumindest partiell die Proliferationshemmung im distalen Augenabschnitt, während die Mitosereduktion im Augensiel eher mit der bereits erwähnten Unterdrückung der absoluten Zahl von Früh- und Spätmitosen interpretiert werden muss.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Das prozentuale Verteilungsmuster der Mitosestadien 4 Stunden nach Strahleneinwirkung stimmt mit jenem der unbehandelten Gruppe weitgehend überein. Dies bedeutet, dass die in einzelnen Evaluationszonen (Gesamte Anlage, ventrale und distale Augenblase) nachgewiesene Proliferationshemmung auf eine allgemeine Abnahme der absoluten Frequenzen von Prophasen, Metaphasen und Ana/Telophasen zurückzuführen ist. Die reduzierten Anteile der drei Mitosestadien könnten möglicherweise mit dem Blockieren des Uebergangs G_2 - Mitose gedeutet werden.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die für die gesamte Augenblase erhaltenen prozentualen Anteile der einzelnen Mitosestadien widerspiegeln eindeutig den Einfluss des Vindesins. So ist die Metaphasen-Häufigkeit signifikant höher als nach alleiniger Strahlenexposition und entspricht jener der Vindesin-Gruppe (siehe Tabelle 17). Nicht signifikant verändert gegenüber den bestrahlten Primordien ist hingegen die Zahl der Prophasen und Ana-/Telophasen. Die Proliferationshemmung nach Kombinationsbehandlung beruht demnach, wie nach VDS allein, auf einer Arretierung der Neuroblasten auf dem Metaphasen-Niveau. Der Beitrag der Röntgenstrahlen an Mitosereduktion offenbart sich in einer stärkeren Herabsetzung der *absoluten* Inzidenzen einzelner Mitosephasen als nach separater Verabreichung von VDS (vergleiche dazu Tabelle 12).

Ein signifikanter Anstieg der Metaphasen-Frequenz gegenüber den bestrahlten Primordien und sogar im Vergleich zum VDS allein erfolgte noch im distalen Augenabschnitt (Region der zukünftigen Retina). Somit ist die Verminderung spontaner Mitoseaktivität in dieser Region nach Kombinationsexperiment ebenfalls auf die Zerstörung der Mitosespindel durch Vindesin zurückzuführen. Dafür sprechen auch die, gegenüber der Kontrolle erniedrigten Werte für Prophasen und Ana-/Telophasen (siehe Tabellen 12 und 17).

Was die ventrale Auswertungszone anbetrifft, so lässt sich keine signifikante Abweichung des Verteilungsspektrums von der bestrahlten Gruppe feststellen. Die höhere durchschnittliche Mitosezahl als nach 0.9 Gy allein hängt vielmehr mit den leicht angestiegenen absoluten Frequenzen der drei Teilungsphasen nach Vorbehandlung mit VDS zusammen.

2.2.2 Untersuchungen 12 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

In der gesamten Anlage stellen die Prophasen immer noch das am meisten verbreitete Mitosestadium dar (48 %). Den zweithöchsten Anteil am Total gezählter Mitosen nehmen die Ana- und Telophasen ein (30 %), während die Metaphasefiguren mit 22 % den niedrigsten Wert erreichen.

Auch in den einzelnen Evaluationszonen des Primordiums kommen die Prophase-Stadien am häufigsten vor. Relativ konstant hält sich in allen Regionen der Anteil an Metaphasen, nämlich zwischen 21 und 25 %. Während die Häufigkeit von Ana/Telophasen in der Retina und Linsenplakode derjenigen von Metaphasen entspricht, übertrifft sie im Augenstiel und in der Pigmentzone die Anteile des letztgenannten Mitosestadiums um 14 bzw. 10 % (siehe Tabelle 18).

Applikation von Vindesin allein.

Gesamthaft setzte VDS 12 Stunden nach Behandlung den prozentualen Anteil an Prophasen zugunsten desjenigen an Metaphasen um etwa 5 % herab ($p < 0.005$). Im Unterschied zum 4 Stunden-Intervall wurde die Häufigkeit von Ana- und Telophasen jedoch nicht vermindert. Ansonsten trifft die gleiche Behauptung zu wie beim früheren Befund, nämlich dass auch eine geringe Metaphasen-Anhäufung zur signifikanten Senkung der Proliferationsrate führen kann.

Die Arretierung der Metaphasen durch das Zytostatikum erreichte einzig im Augenstiel ein statistisch gesichertes Ausmass. Demgegenüber war der Prozentsatz an Prophasen neben der erwähnten Region auch im Retinalabschnitt signifikant verringert (Tabelle 18). Interessant ist, dass in der präsumptiven Netzhaut die relative Häufigkeit von Ana/Telophasen gegenüber der Kontrolle um 6 % anstieg ($p < 0.05$), vielleicht als Kompensation der Unterdrückung von Spätmitosen 4 Stunden nach Behandlung.

Während die Proliferationshemmung innerhalb des Augenstiels und der Retina zumindest partiell mit der suppressiven Wirkung des Alkaloids auf die Frühmitose begründet werden kann, liefert das Mitosemuster keine Erklärung zur Zellteilungsreduktion innerhalb der Pigmentzone und der Linse. Da die relativen Werte kaum einen Metaphasen-Effekt der Substanz widerspiegeln, bestimmen somit die absoluten Häufigkeitsdaten der untersuchten Mitosestadien das Bild der reproduktiven Kapazität von Neuroblasten.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Der wohl bemerkenswerteste Befund 12 Stunden nach Exposition ist die weitgehende Uebereinstimmung des strahleninduzierten Mitosemusters mit jenem der Vindesin-Gruppe (siehe Tabelle 18). In den gleichen Augenregionen wie nach VDS-Zugabe erfolgte eine signifikante Abnahme der prozentualen Prophasenanteile, zusammen mit einer ebenfalls statistisch gesicherten Vermehrung der Metaphasenstadien. Sogar die signifikant erhöhten relativen Häufigkeiten von Ana/Telophasen in der Retina und von Prophasen innerhalb des Augenpigmentes konnten bereits mit dem Zytostatikum erzielt werden.

Vom Verteilungsmuster her scheint somit die verminderte Reproduktionsrate der Neuroblasten in der Gesamten Anlage und im Augienstiel mit der strahlenbedingten Verzögerung des Ueberganges G_2 - Mitose (wie 4 Stunden nach Bestrahlung) und Metaphase - Ana-/Telophase erklärbar.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Wie im Abschnitt "Mitoseaktivität" bereits erwähnt wurde, führt eine kombinierte Anwendung beider Agenzien zur Normalisierung der Zellteilungsfrequenz des Primordialgewebes. Im Einklang zu dieser Feststellung wies auch das mitotische Verteilungsmuster weder gesamthaft noch in den einzelnen Augenregionen eine von der Kontrolle signifikante Abweichung auf.

Im Vergleich zu der bestrahlten Gruppe wurden im Rahmen des proliferativen Erholungsprozesses die Metaphasenanteile in der gesamten Anlage und im Augienstiel signifikant herabgesetzt (Tabelle 18). Auch gegenüber der alleinigen Behandlung mit VDS fand eine "Korrektur" der Prophasen- und Metaphasenwerte innerhalb der betroffenen Gebiete (gesamte Anlage, Augerstiel und Retina) statt, die Zunahme respektive Abnahme der Häufigkeit beider Teilungsfiguren nach Kombinationsbehandlung konnte ebenfalls statistisch gesichert werden.

Somit macht sich, im Unterschied zum Befund 4 Stunden nach Behandlung, im kombinierten Versuch ein Einfluss des Alkaloids (Metaphasen-Effekt) nicht bemerkbar. Auch bezüglich des Kriteriums "Mitosemuster" bestätigt sich die bereits für die Proliferationsaktivität aufgestellte Behauptung, dass eine Kombination der beiden Agenzien den Erholungstrend des primordialen Augengewebes verstärkt.

2.2.3 Untersuchungen 24 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Gesamthaft gesehen sind die prozentualen Anteile einzelner Mitosestadien etwa gleich hoch wie 12 Stunden zuvor (vergleiche Tabellen 19 und 18). Die Prophasen repräsentieren weiterhin das am häufigsten vorkommende Teilungsstadium (46 % aller Mitosen), während die Spätmitosen (Ana- und Telophasen) bereits deutlich seltener auftreten (34 %). Am niedrigsten ist der Prozentsatz an Metaphasen (19 %).

Gewisse Aenderungen dieses allgemein festgestellten Verteilungsmusters weisen die einzelnen Augenstrukturen auf. So kommen im Augenstiel die Früh- und Spätmitosen mit etwa gleicher Häufigkeit vor (41 bzw. 39 %), während im Pigmentepithel Maximalwert für Prophasen (56 %) und niedrigster Prozentsatz an Metaphasen (14 %) nachgewiesen worden ist.

Applikation von Vindesin allein.

Weder im gesamten Primordium noch in den einzelnen Augenregionen weicht das ermittelte Mitosemuster signifikant von demjenigen der unbehandelten Gruppe ab (Tabelle 19). Somit kann von einem Metaphasen-Block, wie er noch 12 Stunden vorher zumindest partiell nachgewiesen wurde, keine Rede mehr sein. Offensichtlich ist 24 Stunden nach Applikation die Anreicherung des Vindesins im Embryonagewebe nicht mehr hoch genug, um eine Arretierung der Zellen in der Metaphase zu bewirken. Die in mehreren Regionen (Gesamte Anlage, Augenstiel und Retina) nachgewiesene Zellteilungshemmung scheint vielmehr durch die Unterdrückung der *absoluten* Häufigkeit von Prophasen (im Gesamtprimordium auch derjenigen von Ana-/Telophasen) bedingt zu sein (siehe auch Tabelle 16).

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Das 24 Stunden nach Strahlenexposition erhaltene Verteilungsmuster wiederholt im Prinzip die Ergebnisse der Analyse der *absoluten* Häufigkeiten einzelner Mitosestadien. So erfolgte im gesamten Primordium und im Augenstiel eine signifikante Abnahme der Prophasenanteile zugunsten der Metaphasen in der Größenordnung von etwa 6 %.

Auch die übrigen Regionen zeichnen sich durch eine (allerdings nicht signifikante) Reduktion der Prophasenhäufigkeit, gekoppelt mit einem signifikanten Anstieg des Prozentsatzes an Metaphasen aus. Das Ausbleiben eines antimitotischen Strahleneffektes kann damit erklärt werden,

dass die *Gesamtzahl* der Mitosen pro Schnitt trotz solcher Verschiebungen des Proliferationsmusters nicht verändert wird. Die Verluste an Prophasen werden nämlich durch das vermehrte Auftreten von Metaphasen kompensiert.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Wie aus der Tabelle 19 ersichtlich wird, geht der Einfluss des Vindesins auf das mitotische Verteilungsmuster sowohl in Einzelapplikation wie auch zusammen mit Röntgenstrahlen verloren. Die nach Kombinationsbehandlung evaluierten Daten reflektieren einzig die Wirkung der abgegebenen Strahlendosis, indem die Metaphasenanteile in allen Auswertungsbereichen gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht sind. Gleichzeitig wurden die Prozentsätze an Prophasen signifikant herabgesetzt, und zwar nicht nur im Gesamtprimordium und Augensiel wie nach alleiniger Strahlenexposition, sondern zusätzlich auch innerhalb der Retina und der Linsengrube.

Dem mitotischen Verteilungsmuster nach müsste die Zellteilungsrate eigentlich mit jener des nur bestrahlten Augengewebes übereinstimmen. Für die nach Kombination beider Agenzien beobachtete Steigerung antiproliferativer Wirksamkeit scheinen somit weniger die Veränderungen der relativen als der *absoluten* Häufigkeiten einzelner Mitosestadien verantwortlich zu sein.

2.3 Zelltod

2.3.1 Untersuchungen 4 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Durchschnittlich enthalten die unbehandelten Augenblasen pro Schnitt 37 tote Zell- oder Kernfragmente. Diese recht hohe Degenerationszahl verdeutlicht die Bedeutung des sogenannten programmierten Zelltodes für die Normalentwicklung der Augen.

Die Verteilung nekrotischer Elemente in der Augenanlage ist jedoch keineswegs homogen. Vielmehr können eigentliche Nekrosezonen unterschieden werden. So offenbart sich die höhere morphogenetische Aktivität der ventralen Region, die sich bereits durch eine verstärkte Proliferationsrate auszeichnete, auch im Ausmass des Zellsterbens. Während über 70 % aller toten Neuroblasten (im Durchschnitt 26 Nekrosen pro Schnitt) im ventralen Augenbereich vorliegen, beinhaltet der distale Abschnitt noch ca. 25 % des gesamten Pyknoseanteils und die übrigen Partien lediglich vereinzelt auftretende Zellresorptionen (siehe Tabelle 20).

Wie die Korrelationsanalyse der Kriterien Mitoserate und Zelltodfrequenz zeigte, besteht ein positiver Zusammenhang zwischen erhöhter Teilungsaktivität der Neuroblasten und vermehrtem Auftreten von abgestorbenen Zellen. Gerade in jenen beiden Augenregionen, die zusammen 77 % des gesamten Mitosepotentials und 95 % aller Nekrosen enthalten, nämlich im ventralen und distalen Bereich, sind statistisch gesicherte Korrelationen der beiden Untersuchungskriterien nachgewiesen worden (Tabelle 22).

Um das Bild des zellulären Untergangs zu vervollständigen, sind die gezählten Nekrosen pro Schnittregion dem Zerstörungsgrad der betreffenden Gewebspartie gemäss in 4 Schädigungskategorien eingeteilt worden. Die Tabelle 21 zeigt die prozentualen Häufigkeiten der Schnitte mit dem jeweiligen Schädigungsausmass innerhalb der Evaluierungszonen des Primordialsauges. Da sich die einzelnen Auswertungsbereiche sowohl in ihrer Ausdehnung wie auch hinsichtlich deren Zellmasse voneinander unterscheiden, ist die mit einem bestimmten Schädigungsgrad verbundene Nekrosenhäufigkeit von Region zu Region verschieden. Mit der Klassifizierung der Zell-Letalität erreicht man somit eine bessere Beschreibung des Verletzungsgrades einer Augenpartie als mit dem Durchschnittswert.

Wie von der Tabelle 21 abgelesen werden kann, zeichnen sich die "Kontrollaugen" durch vereinzelteres oder nur mässiges Auftreten von toten Zellen aus. Während im ventralen und distalen Bereich immerhin in 17 % der Fälle auch grössere Aggregationen abgestorbener Zellfragmente (Kategorien 3 und 4) beobachtet werden konnten, fehlen sie in den restlichen Zonen vollständig. Dieses Muster des programmierten oder morphogenetischen Zellsterbens ist für die Beurteilung der induzierten Nekrose von grösster Wichtigkeit.

Applikation von Vindesin allein.

Vier Stunden nach Abgabe wies Vindesin noch keine zytoletale Eigenschaft auf, sondern im Gegenteil unterdrückte sogar die spontane Zelltodrate um fast 30 % ($p < 0.005$). Die Hemmung der physiologischen Zelldegeneration basiert auf einer signifikanten Abnahme der Nekrosenhäufigkeit im ventralen und distalen Augenabschnitt. Während im Bereich des Augentiels (ventral) der Anteil an toten Neuroblasten um 22 % absinkt, vermindert sich im Bereiche der präsumptiven Retina (distal) die durchschnittliche Zelltodfrequenz um 2/3 des Kontrollwertes (Tabelle 20). Einzig die Linsenplakode weist gegenüber der Referenzgruppe eine leichte Zunahme der Nekrosepopulation auf.

Anders als in den Kontrollaugen erbrachte die Analyse der Beziehungen zwischen Mitoseaktivität und Pyknoschäufigkeit nach Vindesin-Applikation keine gleichsinnige Korrelation der beiden Kriterien. Anscheinend verläuft die Suppression des programmierten Zelluntergangs unabhängig von jener der Proliferationskapazität (Tabelle 22).

Die prozentualen Häufigkeiten der Schnitte mit bestimmter Schädigungskategorie unterstreichen die oben erwähnten Ergebnisse. So drückt sich die hemmende Wirkung des Chemikaliums in bezug auf Zelltod in der Abnahme der Frequenz der beiden höchsten Schädigungsklassen von 16.6 (Kontrolle) auf 5.6 % im Ventralbereich und sogar auf nur 2.4 % im Retinalabschnitt (siehe Tabelle 21). Die Nekroschemmung innerhalb der Netzhaut geht so weit, dass sogar das mässige Erscheinen von Zelltod (Kategorie 2) nur gerade bei 2 % der Schnittpräparate zu sehen war (Kontrolle 26 %).

Weiterhin geht aus der Häufigkeitsverteilung der vier Schädigungsklassen hervor, dass die Zunahme der durchschnittlichen Zelltodrate in der Linsenplakode gegenüber der Kontrolle (Tabelle 20) nur auf eine verstärkte Nekrose in lediglich 1.6 % der Fälle zurückgeht. Generell kann somit festgestellt werden, dass in den einzelnen Augenpartien nach VDS-Behandlung das Erscheinen nur sporadisch auftretender Degenerationen den häufigsten Befund darstellt.

Bestrahlung mit 0.9 Gy Röntgenstrahlen.

Die Augenanlagen der intrauterin exponierten Tiere zeichnen sich durch eine ausgeprägte Zunahme der Zahl abgestorbener Neuroblasten aus. Gesamthaft war die durchschnittliche Zelltodrate um einen Faktor von 2.5 höher als bei der Kontrolle ($p < 0.005$).

Ein Vergleich der einzelnen Auswertungszonen von unbehandelten und behandelten Anlagen zeigt, dass die verabreichte Strahlendosis in allen Augenregionen eine signifikante Zunahme letal geschädigter Zellen induziert hat. So betrug im ventralen Bereich der Anteil an pyknotischen Fragmenten das Doppelte, in der distalen Zone gar das 2.4-fache des entsprechenden Kontrollwertes (Tabelle 20). Die prozentuale Verteilung der Schädigungskategorien (Tabelle 21) ergab bei 59 respektive 64 % aller untersuchten Schnitte für die beiden Regionen einen extensiven bis massiven Zerstörungsgrad des Neuroblastenpotentials.

Auch die dorsale Augenblase und die zukünftige Linse wiesen eine Intensivierung der Zell-Letalität auf, jedoch im deutlich geringeren Ausmass als die übrigen Augenpartien. Es scheint, dass die Neuroblasten der Dorsalregion strahlenempfindlicher sind als das Linsenepithel (16

bzw. 10 % aller Präparate mit Kategorien 3 + 4).

Zu erwähnen ist, dass der Nekroseanstieg (Plakode ausgenommen) stets mit dem Vorgang der Zellvermehrung positiv korreliert ist (Tabelle 22). Folglich ist der Anteil an Degeneration umso höher, je mehr Zellen in die Mitose eintreten. Dies würde bedeuten, dass der Empfindlichkeitsgrad der Neuroblasten auf zell-letale Strahlenwirkung abhängig ist vom Proliferationsstatus. Eine andere biologische Ueberlegung wäre die, dass bei einer vermehrten Letalität die Reproduktionsrate der überlebenden Zellen kompensatorisch gesteigert wird.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die Vorbehandlung mit VDS erhöhte die strahleninduzierte Nekrose gesamthaft um einen Faktor von 1.8 ($p < 0.005$). Der Durchschnittswert von 171 toten Zellen/Schnitt (Tabelle 20) übersteigt also die Summe der Einzelwirkungen beider Noxen um 43 %! Da Vindesin allein zum gegebenen Untersuchungszeitpunkt keine Zunahme spontaner Nekroserate bewirkte, kann zumindest für das Kriterium "Zelltod" ein strahlensensibilisierendes Vermögen des Onkolytikums postuliert werden.

Eine Verdoppelung der Degenerationshäufigkeit gegenüber Bestrahlung allein fand innerhalb des ventralen Augenbezirks statt. Der Kombinationseffekt liegt dabei 45 % über der Additivitätsebene (synergistische Wechselwirkung). Die Analyse prozentualer Frequenzen von Schädigungskategorien ergab nur noch gerade bei 2.5 % aller ausgewerteten Schnitte keine extensive oder massive Ausbreitung vom Zelltod. Insbesondere die Inzidenz der Kategorie 4 (praktisch kein Zellüberleben mehr) erhöhte sich gegenüber der bestrahlten Vergleichsgruppe von 21 auf 86 % (siehe Tabelle 21).

Im Bereich der zukünftigen Netzhaut (distale Region) wurde die Häufigkeit des zellulären Strahlentodes durch das Alkaloid um einen Faktor von 1.8 erhöht ($p < 0.005$). Obwohl die strahlenpotenzierende Wirkung der Substanz geringer ist als im Ventralbereich, umso ausgeprägter zeigt sich die Wechselbeziehung zwischen VDS und Röntgenstrahlen. Mit durchschnittlich 40.3 Nekrosen/Schnitt in diesem Abschnitt wird nämlich die Summe der Einzelwirkungen um 59 % (!) überschritten.

Aehnlich wie im Falle der ventralen Auswertungszone wurde bei 94 % der untersuchten Präparate das Ueberleben der Retinalzellen oft im höchsten Grade beeinträchtigt. Der Anteil an massivem Zelltod erreichte das Dreifache (69 %) desjenigen der nur strahlenexponierten

Augenpartie.

Die zukünftige Pigmentzone (Dorsalbereich) reagierte auf die kombinierte Behandlung deutlich weniger empfindlich als die vorher aufgeführten Augenpartien. So war die durchschnittliche Nekroserate nur um 13 % höher als nach alleiniger Bestrahlung ($p < 0.005$) und bringt dadurch einen *additiven* Reaktionsmodus der beiden Agenzien zum Ausdruck. Auch die Untersuchung der prozentualen Schädigungsfrequenzen ergab für die Klassen 3 + 4 lediglich Werte im Bereich der alleiniger Strahlenapplikation (siehe Tabelle 21).

Demgegenüber deutet die für die Linsenplakode erhaltene Nekrosezahl erneut auf eine synergistische Wechselbeziehung zwischen VDS und Strahlen hin. Im Vergleich zur bestrahlten Gruppe nahm der Anteil an Zelldegeneration um einen Faktor von 1.6 zu ($p < 0.05$) und war immerhin um 35 % höher als die Summe der Einzeleffekte. Die strahlenpotenzierende Eigenschaft von Vindesin äusserte sich auch im Anstieg der Häufigkeit der Kategorien 3 + 4 von 10 (0.9 Gy allein) auf 35 % und derjenigen des massiven Zelltodes von 0.8 auf 18.3 %.

Die Korrelationsanalyse ergab einzig für die ventrale Zone eine positive Beziehung zwischen Mitoseaktivität und Zelltod. Somit gilt, wie nach alleiniger Strahlenanwendung, dass bei einem besonders grossen Zerstörungsausmass (in der Ventralregion wurden bis 160 Pyknosen pro Schnitt gezählt) die Zellverluste durch eine vermehrte Mitoseaktivität ausgeglichen werden müssen (vergleiche dazu auch die Tabellen 11 und 20).

Interessant ist die Anwesenheit zellulärer Ueberreste im Augenlumen. Solche "ausgeschiedene" Fragmente wurden bereits nach einer alleinigen Bestrahlung registriert und gelten als ein Zeichen beginnender Regenerationstätigkeit des Primordialgewebes. Die Ueberreste bestehen aus kleineren oder grösseren Zusammenballungen aller Degenerationsstadien, von ganzen Zellpyknosen bis zu kleinsten Fragmenten als Resultat der Kernsprengung (Karyorhexis). In den meisten Fällen wurden die ausgeschiedenen Nekrosen im Bereiche des Augenstiels oder/und der Retina, also dort wo bereits im Gewebe das Zellsterben am häufigsten vorkommt, vorgefunden. Allerdings war in einigen Präparaten das Augenlumen trotz massiver Nekrose frei von toten Fragmenten.

Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Daten, dass eine Vorbehandlung mit Vindesin die Strahlennekrose zu intensivieren vermag. Die strahlensensibilisierende Eigenschaft des Zytostatikums ist im ventralen Augenabschnitt am stärksten entwickelt und in den Regionen der Linse und des präsumptiven Augenpigments eher abgeschwächt. Demgegenüber zeichnete sich

innerhalb der zukünftigen Netzhaut (Distalbereich) die ausgeprägteste synergistische Wirkungsreaktion der beiden Agenzien hinsichtlich des Kriteriums Zelltod ab.

2.3.2 Untersuchungen 12 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Wie beim früheren Entwicklungsstadium weisen die Augenanlagen normalerweise keineswegs ein homogenes Verteilungsmuster abgestorbener Zellen auf. Vielmehr sind die gezählten Pyknosen in den Kontrollprimordien fast ausschliesslich an morphologisch eng begrenzte Stellen gebunden.

So findet sich im Augensiel das programmierte Zellsterben stets im distalsten Drittel. Die Neuroblasten der präsumptiven Retina degenerieren hingegen am häufigsten am ventralsten Pol. Innerhalb des Pigmentepithels konzentrieren sich die Zellüberreste auf den distalsten und proximalsten Abschnitt, während die Linsenplakode Zellresorptionen nur im ventralsten Bezirk aufweist. Gesamthaft gesehen bestehen also neben morphogenetisch aktiver Augenbereiche auch vollkommen nekrosefreie Gewebsabschnitte. Dieses Bild soll festgehalten werden, da sich eine induzierte Vermehrung der Zelltodfrequenz stets in *flächenmässiger* Ausbreitung der bereits feststehenden Nekrosezonen äussert.

In quantitativer Hinsicht erhält man pro Schnitt durchschnittlich 69 tote Zellen, die Nekrosezahl ist somit im Vergleich zum 4 Stunden-Intervall um 86 % angewachsen. Ähnlich der Mitoseaktivität zeigte auch bezüglich des Kriteriums Zelltod die Retina innerhalb von 8 Stunden eine höhere Inzidenz (um einen Faktor von 2.5) als die ventrale Augenregion (nur um Faktor von 1.5).

Weiterhin geht aus der Tabelle 23 hervor, dass mit dem Mittelwert von 40 Pyknosen pro Schnitt der Augensiel immer noch am meisten Zelltod beinhaltet (58 % aller gezählten Nekrosen). Mit der fortschreitenden Differenzierung der Neuroblasten stieg gleichzeitig in der Retina der Anteil an Pyknosen von 25 % (4 Stunden-Intervall) auf 33 % an. Im Vergleich zur Pigmentzone (3 % aller Nekrosen) erscheint die Linsenplakode als der morphogenetisch aktivere Teil der Augenanlage (6 % des gesamten Nekrospotentials).

Es ist interessant, dass im Unterschied zum 4 Stunden-Intervall die beiden Parameter Mitoseaktivität und Zelltod im Augensiel nicht positiv, sondern *negativ* miteinander korreliert sind. Eine Zunahme des Zellsterbens wird somit nicht mit einer verstärkten

Proliferationsaktivität kompensiert. Weiterhin einen positiven Korrelationsmodus erhält man für den Retinaldistrikt (siehe Tabelle 25). Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dass sich während der Normalentwicklung des Auges der Beziehungsmodus zwischen den erwähnten Untersuchungskriterien je nach der untersuchten Regionen ändern kann.

Die prozentualen Häufigkeiten der Schnitte mit einer bestimmten Zelltod-Frequenz (Tabelle 24) zeigen, dass extensive bis massive Nekrose vornehmlich im distalen Bereich des Augenstiels anzutreffen ist. Die recht hohe Inzidenz der Kategorien 3 und 4 (total 27.5 %) deutet darauf hin, dass eine lokal begrenzte Anhäufung nekrotischer Elemente für den richtigen Ablauf der Organentwicklung von grösster Bedeutung sein muss. Innerhalb der Retina kommt eine Ausbreitung degenerativer Veränderungen auf extensiver Basis bereits viel seltener vor (5.8 % aller Fälle). Die restlichen Auswertungszonen zeichnen sich nur noch durch das vereinzelte Auftreten pyknotischer Fragmente aus.

Applikation von Vindesin allein.

Wie aus Tabelle 23 hervorgeht, wirkte Vindesin 12 Stunden nach Behandlung erstmals letal auf die Embryonalzellen. Die Erhöhung der spontanen Zelltodrate durch das Chemikali-um ist in *allen* Evaluationszonen statistisch hochsignifikant. Der Gesamtdurchschnittswert von 130.9 Nekrosen pro Schnitt bedeutet eine Vermehrung des Anteils an abgestorbenen Neuroblasten um einen Faktor von 1.9 gegenüber der Kontrolle.

Was die einzelnen Augenregionen anbelangt, war die mittlere Zelltodfrequenz im Augenstiel um 76 % und in der Retina sogar um 90 % höher als bei der unbehandelten Gruppe. Auch innerhalb der Pigmentzone und der Linsenplakode wuchs der Degenerationsanteil auf das 3.8 bzw. 2.3-fache des Referenzwertes an.

Bei der Bestimmung des Ausmasses an zellulärer Zerstörung (Tabelle 24) interessiert vor allem die Häufigkeit der beiden höchsten Schädigungsklassen (3 und 4). Erfolgt die Schädigung nämlich nur im Rahmen einer niedrigen Kategorie (z.B. mässige Nekrose), so erholt sich das involvierte Embryonalgewebe mit grösserer Wahrscheinlichkeit als bei ausgeprägten Zellverlusten.

Der höchste Prozentsatz an Präparaten mit extensiver bis massiver Nekrose wurde für die Region des Augenstiels registriert (56.7 %, Kontrolle: 27.5 %). Insbesondere die Inzidenz der Kategorie 4 (massiver Zelltod) erreichte mit 41.5 % das 3.2-fache des Kontrollwertes. Die zukünftige Netzhaut zeichnete sich mehrheitlich durch mässigen Zelltod (51.6 %) aus. Immerhin

trat bei 33 % aller Präparate zum gleichen Teil extensiver oder massiver Tod von Retinalneuroblasten auf (bei der Referenzzone nur Klasse 3 mit 5.8 % Häufigkeit). Weiterhin zeigte die histologische Analyse, dass die statistisch gesicherte Degenerationszunahme in der Pigmentregion einzig durch das Auftreten der Klasse 2 in 9.2 % aller Fälle (Kontrolle: nur Klasse 1) ausgelöst worden ist. Die Linsenplakode, die im unbehandelten Zustand lediglich vereinzelte Pyknosen beinhaltet, reagierte dagegen deutlich empfindlicher auf Vindesin als die vorhererwähnte Augenregion. Die beiden höchsten Schädigungskategorien erreichten zusammen immerhin eine Häufigkeit von 17.5 %, wobei das Bild des massiven Zelluntergangs vorherrschte.

Die Korrelationsanalyse zeigte für die Kriterien Mitoseaktivität und Zelltod eine *negative* Beziehung, und zwar nicht nur im Augensiel wie bei der Kontrolle, sondern auch in der gesamten Anlage und Retina (Tabelle 24). Die recht hohen Korrelationskoeffizienten für die erwähnten Regionen deuten darauf hin, dass die Reduktion der Proliferationsrate durch Vindesin mit dem verminderten Anteil an überlebenden Zellen zusammenhängt.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Die Untersuchung der Augenanlagen 12 Stunden nach Strahlenexposition lieferte einen eindrucklichen Beweis embryonaler Erholungspotenz. Die zum früheren Zeitpunkt gesetzte schwere Schädigung der Neuroblasten ist nicht nur behoben, sondern sogar auf ein die Kontrollebene *unterbietendes* Mass gebracht worden. Dies kann als ein Zeichen überkompensatorischer Tätigkeit gewertet werden. So war in der gesamten Anlage die spontane Nekroserate nach Bestrahlung um 18 %, im Augensiel gar um mehr als 30 % herabgesetzt. Diese Unterschiede zur Referenzgruppe sind statistisch gesichert (siehe Tabelle 23). Auch die Retina zeichnete sich durch eine Normalisierung der Zelltodfrequenz aus. Mit 5 bis 6 toten Zellen pro Schnitt in den Regionen der Linse und des Pigmentepithels war der pyknotische Anteil zwar signifikant höher als bei der unbehandelten Gruppe, dürfte jedoch angesichts so geringer Ausprägung für die weitere Organentwicklung kaum nachteilige Konsequenzen haben.

Die strahlenbedingte Senkung des Nekrosepotentials in den einzelnen Auswertungszonen verdeutlicht auch Tabelle 24. So nahm im Augensiel die Häufigkeit extensiver Pyknose von 14.5 % (Kontrolle) auf 0.8 % ab, während massiver Zelltod sogar vollständig fehlte (Kontrolle: 13 %). Auch in den übrigen Augenregionen wurde nirgends eine höhere Schädigung als im Rahmen der Kategorie 2 (mässige Nekrose) registriert. Die Tatsache, dass 4 Stunden nach

Bestrahlung die Inzidenz der beiden höchsten Schädigungsklassen beispielsweise im ventralen und distalen Distrikt auf etwa 60 % angestiegen ist, hebt die Regenerationskapazität des Primordialgewebes noch mehr hervor.

Es ist interessant, dass für die beiden Auswertungsbereiche mit reduzierten Nekroseanteilen (gesamte Anlage, Augenstiel) eine *positive* Beziehung zwischen Mitose und Zelltod nachgewiesen worden ist. Damit wäre, im Unterschied zur Reaktion auf Vindesin, die Proliferationsabnahme in den betreffenden Regionen mit einer verringerten Zelltodrate zu erklären.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

In Kombination mit Röntgenstrahlen büsste Vindesin stark von seiner Zytotoxizität ein. Werden die erhaltenen Werte mit jenen der VDS-Gruppe verglichen, so kann die Abnahme der Zelltodrate nach der Kombinationsbehandlung für alle Bereiche des Primordiums statistisch gesichert werden. Dabei wurde die zytoletale Eigenschaft des Alkaloids im Augenstiel um 33 %, in der Retina um 44 %, in der Pigmentzone um 37 und in der Linsenplakode sogar um 48 % herabgesetzt (Tabelle 23). Die suppressive Wirkung der Röntgenstrahlen hinsichtlich des VDS-induzierten Zelltodes führt dazu, dass die Zelldegeneration nach kombinierter Behandlung gegenüber der Kontrolle nur noch um ca. 20 % zunimmt (Gesamte Anlage, Augenstiel, Linse). Der *antagonistische* Reaktionsmodus zwischen den beiden Agenzien bewirkt, dass die Nekrose-rate in der Retina nicht mehr signifikant von jener der Kontrolle abweicht (nach alleiniger VDS-Zugabe noch um 90 % höher !).

Auch die prozentualen Häufigkeiten der vier Schädigungsklassen bestätigen die obenerwähnten Resultate. So verminderte sich der Anteil an extensiver und massiver Nekrose gegenüber VDS allein im Augenstiel von 56.7 auf 29.2 %, in der Retina von 33.4 auf 5.8 % und in der Linse von 17.5 auf nur 0.8 % (siehe Tabelle 24). Im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ist einzig im Augenstiel-Bereich die Frequenz der Kategorie 4 geringfügig angestiegen (von 13 auf 18.4 %).

Weiterhin zeigte sich, dass in der Retina die Kriterien Mitoseaktivität und Zelltod, übereinstimmend mit dem Kontrollbefund, gleichsinnig miteinander korreliert sind. Für die restlichen Regionen konnte keine Beziehung zwischen den beiden Untersuchungskriterien festgestellt werden.

Die Kombinationsbehandlung führt somit je nach Untersuchungsintervall zu vollkommen unterschiedlichen Ergebnissen. Wirkte Vindesin 4 Stunden nach Behandlung als

Strahlensensibilisator, so wurde 8 Stunden später die Toxizität des Zytostatikums durch die nachfolgende Bestrahlung unterdrückt. Die synergistische Interaktionsweise zwischen den beiden Agenzien ist folglich zeitlich limitiert.

2.3.3 Untersuchungen 24 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Im Vergleich zum vorherigen Stadium ist die Augenanlage vor allem durch zwei Umbildungsprozesse gekennzeichnet: 1. grössere Verdickung und Einbuchtung der Retina in proximaler Richtung (Augenbecher-Bildung) und 2. Invagination der Linsenplakode zur Linsengrube (auch Linsenbecher genannt).

Die Modellierung dieser Strukturen bedingt nebst spezifischer Induktionsvorgänge und Gewebe-Neubildung auch zellulären Abbau an den entsprechenden Stellen. Was die Nekrosezonen angeht, so hat sich deren Lage auch im Verlaufe von 12 Stunden nicht grundlegend verändert. Im Augentielbereich findet man die meisten toten Zellen beispielsweise immer noch am vordersten (distalsten) Pol, wobei bei stärkerer Schädigung fast die ganze distale Hälfte nekrotisch werden kann. Das programmierte Zellsterben greift vom Augentiel her übergangslos auf die präsumptive Netzhaut über. Dabei gehen vorzugsweise die Neuroblasten des ventralen Retinalabschnitts zugrunde, seltener auch jene unterhalb der tiefsten Linseneinstülpung und am dorsalsten Ende. Kommt es zur Vermehrung pyknotischer Ueberreste auf extensiver Basis, so kann das gesamte Netzhautgewebe von toten Zellen durchsetzt werden. In der Region des Pigmentepithels konzentrieren sich die Degenerationen fast ausschliesslich auf den hintersten (proximalsten) Teil. Demgegenüber zeichnet sich die zukünftige Linse durch *zwei* Nekrosezonen aus, nämlich im Bereiche der beiden Involutionsstellen des Oberflächenektoderms.

Die Zählung abgestorbener Neuroblasten bestätigte die allgemein bekannte Tatsache, dass während der Morphogenese der Anteil an physiologischem Zelltod mit fortschreitender Organdifferenzierung abnimmt. Am Tag 9 1/2 war dies noch nicht der Fall, die Nekroserate wuchs gegenüber dem jüngeren Primordium durchschnittlich um 86 % an, am Tag 10 zeichneten sich jedoch gegenläufige Tendenzen ab. So lag gesamthaft die Degenerationszahl mit 53.2 Pyknosen pro Schnitt um 23 % *tiefer* als beim weniger differenzierten Entwicklungsstadium. Um den gleichen Betrag (24 %) war die Nekroserate auch in der Retina erniedrigt, während sich im Augentiel der Anteil an Zelltod nach 12 Stunden sogar um ganze 67 % verringerte. Einzig innerhalb der Pigmentzone und der Linse erfolgte im Verlaufe der Zeit ein Anstieg der

Nekrosenzahl um einen Faktor von 4.3 bzw. 3.6 (siehe Tabelle 26).

Diese Befunde beweisen, dass sich das morphogenetische Aktivitätsmuster infolge struktureller Umwandlungsprozesse einzelner Augenpartien verändern kann.

Werden die für jede Auswertungsstruktur ermittelten Zelltod-Frequenzen prozentual zum Gesamtdurchschnittswert ausgedrückt, so bekräftigen sich die bereits angedeuteten Trends. So weist der Augenstiel lediglich 25 % aller gezählten Nekrosen auf, also nur noch die Hälfte des früheren morphogenetischen Potentials. Der prozentuale Anteil an Zelltod in der Retina hat sich innerhalb der letzten 12 Stunden nicht geändert und ist mit 33 % höher als in den übrigen Augenteilen. Die entstehende Linse übertrifft punkto Gewebsabbau, der gegenüber dem weniger differenzierten Entwicklungsstadium von 6 auf 27 % angestiegen ist, sogar die sonst viel aktivere Augenstielregion. Die Pigmentzone weist noch 15 % des totalen Nekrosepotentials auf und ist somit bedeutend ärmer an Zellresorptionen als das Linsenepithel.

Die Analyse der Wechselbeziehungen zwischen dem Zelltod und der Zellvermehrung zeigte, dass die beiden Prozesse in der Retina und Linse völlig unabhängig voneinander ablaufen. Einen *negativen* Korrelationsmodus erhielt man hingegen für die Auswertungsbereiche Gesamtprimordium, Augenstiel und Pigmentzone. Dies würde heissen, dass in den betreffenden Gebieten umso weniger Degenerationen erscheinen, je höher die Zahl der sich im Teilungszustand befindenden Neuroblasten ist, et vice versa.

Die in Tabelle 27 angegebenen Inzidenzen der 4 Schädigungskategorien vervollständigen das Bild des morphogenetischen Nekroseusters. So wird ersichtlich, dass die Region des Augenstiels nur noch in 5.8 % aller Fälle extensiven bis massiven Zelltod aufweist. Obwohl in der präsumptiven Netzhaut die mittlere Pyknosezahl ein wenig höher lag als in der letztgenannten Zone, erfolgte dieser Zuwachs nur im Rahmen der Kategorie 2 (mässiger Zelltod). Während das Augenpigment fast ausschliesslich vereinzelte Zelldegenerationen enthielt, zeichnete sich die Linsengrube durch den höchsten Prozentsatz an Schnitten mit mässigem Schädigungsgrad aus (23.3 %).

Generell zeigte sich im Augenprimordium am Tag 10 der Gestation eine Tendenz zur Reduktion des Gewebsabbaus. Eine Ausnahme bildet dabei die werdende Linse, welche zum gegebenen Zeitpunkt morphogenetisch stärker aktiviert ist als bei den früheren Anlagen.

Applikation von Vindesin allein.

Die 12 Stunden nach Zugabe beobachtete zytoletale Wirkung des Alkaloids hielt auch einen halben Tag später noch an. In allen Auswertungsbereichen mit Ausnahme des Augenstiels zeigte sich ein signifikanter Degenerationsanstieg gegenüber der Kontrolle (siehe Tabelle 26). Im gesamten Primordium erhöhte VDS die spontane Zelltodfrequenz von durchschnittlich 53.2 auf 89.6 Pyknosen pro Schnitt, was einen Zuwachs von 68 % darstellt.

Die ausgeprägteste letale Schädigung neuraler Elemente erfolgte jedoch im Bereiche der präsumptiven Retina. Durch die Behandlung vermehrte sich der Anteil an abgestorbenen Zellen um einen Faktor von 1.98, also praktisch um 100 % !. Die zweithöchste Inzidenz von toten Fragmenten wurde innerhalb der Linsengrube ermittelt, nämlich durchschnittlich 24.7 Zellresorptionen pro Schnitt (d.h. 72 % mehr als bei der Kontrolle). Mit 14.4 Nekrosen pro Schnitt reagierte die Pigmentzone bereits deutlich weniger empfindlich auf Vindesin als das Linsenepithel.

Trotz der Potenzierung der spontanen Nekrosenrate durch das Chemikaliu darf nicht unerwähnt bleiben, dass die Zytotoxizität von VDS gegenüber 12 Stunden nach Behandlung geringer ausfällt. Die im *Augenstiel* registrierte Erholung vom induzierten Zelltod ist ein Beweis für das Regenerationsvermögen des embryonalen Augengewebes. Die nachlassende zytoletale Eigenschaft des Alkaloids zeichnet sich auch im gesamten Primordium und in der Netzhaut ab. Innerhalb dieser Auswertungsbereiche lag die Nekrosezahl 12 Stunden zuvor nämlich noch um 32 bzw. 21 % höher. Einzig in den Regionen des Augenpigments und der Linse hielt die Wirkung des Zytostatikums zum gegebenen Zeitpunkt nicht nur an, sondern verstärkte sich sogar um einen Faktor von 2 bzw. 2.7 (vergleiche Tabellen 26 und 23).

Die Tabelle 27 liefert zusätzliche Informationen zum Zerstörungsausmass des Primordialgewebes durch das Chemikaliu. So wird die Reparationskapazität des Augenstiels dadurch bestätigt, dass die prozentualen Häufigkeiten aller Schädigungsklassen im Kontrollbereich liegen. Innerhalb des Pigmentzone vermehrte sich die Nekrosenfrequenz lediglich im Rahmen der Klasse 2 (mässiger Zelltod). Demgegenüber war die Häufigkeit der Kategorie 2 im Linsenepithel mit 48 % deutlich höher als im Pigmentbereich (21 %), und in 17 % der Fälle kam es sogar zum extensiven Zelltod. Die höchste Sensibilität auf Vindesin wies die Region der entstehenden Netzhaut auf. Fast 30 % aller ausgewerteten Schnittpräparate zeichneten sich durch einen extensiven bis massiven Zerstörungsgrad der Neuroblasten aus (Kontrolle: 0.8 %)

Bezüglich des Korrelationsmodus der beiden Kriterien Mitose und Zelltod sei nur erwähnt, dass dieser für die Linse als einzige Augenstruktur *positiv* ausgefallen ist (Tabelle 28). In den übrigen Auswertungsbereichen mit signifikanter Zunahme des Pyknoseanteils (Gesamte Anlage, Retina und Pigment) verlaufen die Prozesse der Zellerneuerung und des Zellabbaus hingegen unabhängig voneinander.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Wie bereits 12 Stunden nach Exposition mit 0.9 Gy beobachtet wurde, erholt sich das embryonale Augengewebe mehrheitlich von der 8 Stunden zuvor induzierten schweren Strahlennekrose. Unter "mehrheitlich" versteht man die abgeschlossene Regeneration in Bereichen des Augenstiels und der Retina, während in der Pigmentzone und der Linsenplakode die Zelltodanteile noch nicht ganz mit den Kontrollwerten übereinstimmen. Die signifikante Zunahme der spontanen Degenerationszahl von durchschnittlich 14.4 auf 14.9 Nekrosen/Schnitt innerhalb der Linse ist sicherlich als unbedeutend zu werten. Auch die Pigmentzone weist, als "Ueberbleibsel" von vorher, eine leichte (allerdings nicht signifikante) Zunahme der Zellletalität gegenüber der Kontrolle auf. Uebrigens ist dies die einzige Augenpartie, in der eine (negative) Korrelation der beiden Kriterien Zelltod und Mitoseaktivität nachgewiesen worden ist (Tabelle 28).

In bezug auf die Prozentualanteile bestimmter Schädigungsgrade wurde festgestellt, dass bei einigen Augenstrukturen (Stiel, Retina, Linse) eine Nekrosesteigerung auch auf extensiver bis massiver Basis vorkommen kann (Tabelle 27). Da die Unterschiede zur Kontrollgruppe jedoch nur in der Grössenordnung von einigen Prozenten liegen, drücken sie sich in den entsprechenden Mittelwerten nicht aus (Ausnahme: Linsengrube). Die für Pigmentzone geschehene Zunahme der durchschnittlichen Pyknosezahl von 8.1 (Kontrolle) auf 12.7 pro Schnitt beruht einzig auf strahlenbedingter Vermehrung der Kategorie 2 (mässige Nekrose) von 3.3 auf 22.5 %.

Die Resultate der Augenanalyse 24 Stunden nach Strahleneinwirkung lassen sich in folgenden 3 Punkten zusammenfassen:

1. Die 12 Stunden zuvor noch stellenweise auftretende *Unterdrückung* des programmierten Zelluntergangs wurde behoben, alle Werte liegen im Kontrollbereich.
2. Die anhaltende Erholung des Primordialgewebes vom Zelltod beweist, dass die kurz nach Bestrahlung ausgelöste Nekrosewelle nicht erneuert wird.

3. Das Repairsystem des Mausembryo besitzt die Fähigkeit, *sowohl* das Zellsterben wie auch die Zellvermehrung auf eine der Normalentwicklung entsprechende Ebene zu bringen.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Prinzipiell unterscheiden sich die 24 Stunden nach Kombinationsbehandlung erhaltenen Resultate nicht von denjenigen, die 12 Stunden früher erhoben wurden. So *verringert* sich die Toxizitätswirkung des Alkaloids, falls dieses zusammen mit Röntgenstrahlen verabreicht wird. Mit Ausnahme des Augenstiels ist die Abnahme der Nekroserate gegenüber alleiniger VDS-Zugabe in allen Auswertungsregionen statistisch gesichert.

Insgesamt verliert das Chemikalium im Kombinationsversuch etwa ein Drittel seiner zytoletalen Eigenschaft. Auch in den Bereichen der Retina und des Augenpigments vermindert sich die Schädigungskapazität des Vindesins durch Nachbestrahlung um ungefähr den gleichen Betrag (31 resp. 33 %). Demgegenüber ist der Anteil an toten Neuroblasten in der Linse um ganze 60 % kleiner als bei der Vindesin-Gruppe, d.h. die Alkaloidwirkung wird doppelt so stark gehemmt wie in den übrigen Regionen.

Die Bestrahlung der mit VDS behandelten Tiere führte dazu, dass nur noch in der präsumptiven Retina und Pigmentzone die Zahl toter Zellen signifikant höher war als in den Kontrollaugen, und zwar um 37 bzw. 18 % (Tabelle 26). Anbetracht der Tatsache, dass zum gegebenen Zeitpunkt die Röntgenstrahlen allein keinen Zelltod bewirken, kann definitionsgemäss nicht nur eine *antagonistische* Wechselbeziehung zwischen den beiden Noxen postuliert werden, sondern sogar ein strahlenbedingter *Schutz* embryonaler Augenzellen vor letalen Auswirkungen der Vindesin-Behandlung.

Auch die prozentuale Verteilung der einzelnen Schädigungskategorien (Tabelle 27) zeigt, dass die zukünftige Netzhaut trotz Suppression der Vindesinwirkung durch Nachbestrahlung immer noch die *empfindlichste* Augenregion darstellt. So wurde die Gesamthäufigkeit der Klassen 3 und 4 zwar von 27.5 % (VDS allein) auf 11.7 % herabgesetzt, ist jedoch immer noch viel höher als bei der Kontrolle (0.8 %). Viel ausgeprägter ist die Toxizitätsabnahme des Chemikaliums in den übrigen Augenabschnitten. Insbesondere in der Linsengrube wurde der Vindesin-induzierte Nekrosezuwachs durch die verabreichte Strahlendosis dermassen stark reduziert, dass der Kontrollwert für die Klasse 2 (23.3 %) um 2/3 unterboten worden ist (7.5 %).

Somit hält die *protektive* Wirkung ionisierender Strahlen in bezug auf den Vindesin-induzierten

Neuroblastentod auch 24 Stunden nach Kombinationsbehandlung noch an. Im Vergleich zum früheren Untersuchungsintervall hat sich dieser Schutzeffekt sogar teilweise noch verstärkt, indem in einigen Augenpartien die Zytotoxizität der Substanz vollständig unterdrückt wird. Gleichzeitig zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die strahlensensibilisierende Eigenschaft des Zytostatikums wirklich nur auf die kurze Periode 4 Stunden nach Behandlung beschränkt bleibt.

2.4 Phagozytose

2.4.1 Untersuchungen 4 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Unter Phagozytose versteht man im allgemeinen das Einverleiben und anschliessende Verdauen von totem Zellmaterial innerhalb der für diese Aufgabe spezialisierten "Säuberungseinheiten", der sogenannten Phagozyten oder Makrophagen. Die für eine Normalentwicklung äusserst wichtige Funktion solcher Fresszellen ist die Eliminierung nekrotischer Fragmente, um den überlebenden Zellen genügend Proliferationsraum zu gewährleisten.

Gerade während der besonders störungsempfindlichen Organbildungsphase, mit ihrer höchst ausgewogenen Beziehungen zwischen Zellvermehrung, Zelltod und Induktionsvorgängen, sollte der Vorgang der Phagozytose mit verstärkter Aufmerksamkeit verfolgt werden. Bereits geringste Störungen der embryonalen Erholungskapazität können nämlich für den pränatalen Organismus weitreichende Auswirkungen haben (z.B. Wachstumsreduktionen, Missbildungen). Um das durch eine bestimmte Behandlung induzierte Schädigungsausmass des untersuchten Gewebes richtig beurteilen zu können, muss somit ausser der Mitoschemmung oder Zelldegeneration auch der Aktivierungsgrad des vorgeburtlichen Regenerationssystems mitberücksichtigt werden.

Das Entfernen von abgestorbenen Zell- oder Kernresten geschieht nicht nur mit Hilfe der speziell zu diesem Zweck in das geschädigte Gebiet eingewanderten Makrophagen. Vielmehr können auch "normale" Nachbarzellen das Verdauen pyknotischer Fragmente übernehmen, vielleicht als zusätzliche Verstärkung des Erholungssystems bei gesteigertem Nekroseanteil. Letztlich muss auch noch die Möglichkeit der Autophagie oder Autolyse letal verletzter Zellen mittels der von diesen selbst produzierten Lysosomen in Betracht gezogen werden.

Alle diese Vorgänge sollen die Komplexität der unter dem Oberbegriff Phagozytose verlaufenden Erholungsprozesse verdeutlichen. In unseren zytologischen Untersuchungen können rein vom

lichtmikroskopischen Erscheinungsbild her kaum Aussagen hinsichtlich des primordialen Eliminationsmechanismus getroffen werden. In histologischen Schnitten präsentieren sich die phagozytierenden Einheiten nämlich stets als relativ grosse Zellen mit hellem Zytoplasma, die in ihren Innern ein bis mehrere (bis 10) pyknotische Fragmente enthalten. Diese Zellen können sich in Ruhephase befinden oder aber auch im Stadium der Teilung. So wurden immer wieder nekrotische Einschlüsse innerhalb von Mitosestadien wie Prophasen, Metaphasen und Ana/Telophasen vorgefunden. Solche mitotisch aktive Phagozyten können von den nichtproliferierenden jedoch nur anhand der meist geringeren Zahl aufgenommener Pyknosen unterschieden werden. Die verminderte Aufnahmekapazität sich teilender Fresszellen beruht auf der mehr Platz beanspruchenden Chromatinsubstanz. Ob es sich bei den Eliminationseinheiten um spezialisierte Makrophagen oder um umfunktionierte Nachbarzellen handelt, kann lichtoptisch nicht unterschieden werden.

In quantitativer Hinsicht wurden durchschnittlich 3.2 Phagozyten pro Augenblase-Schnitt registriert (Tabelle 29). Da das Auftreten von Abräumungszellen positiv mit dem Nekrotisierungsgrad der Auswertungszonen korreliert ist (Tabelle 30), findet man die höchste Anzahl Makrophagen sinngemäss in ventralen Blasenbereich (maximal 11 Phagozyten, Durchschnitt 2.6 pro Schnitt). Während die distale Zone, in Uebereinstimmung mit geringerer Zelltodrate, bereits eine starke Abnahme der Phagozyteninzidenz aufweist (maximal 5 pro Schnitt), sind im Linse-nepithel bei insgesamt 174 Präparaten lediglich 3 Makrophagen und im dorsalen Augenteil nur eine einzige Fresszelle festgestellt worden.

Applikation von Vindesin allein.

Da die Häufigkeit von Phagozyten mit jener des Zellsterbens gleichsinnig korreliert ist, zeigte die Behandlung mit VDS eine signifikante Abnahme der Fresszellen-Inzidenz gerade in Abschnitten mit reduziertem Degenerationsanteil (vergleiche Tabellen 20 und 29). Sowohl das gesamte Primordium wie auch der Augentiel enthalten im Durchschnitt nur noch halb so viele Makrophagen wie die Kontrolle und die präsumptive Retina sogar lediglich ein Sechstel des Referenzwertes. Maximal wurden 6 Phagozyten im Ventraldistrikt und 2 im Distalbereich gezählt. Alle diese Befunde demonstrieren, dass die Aktivierung des embryonalen Abwehrsystems in enger Beziehung steht zum numerischen Anteil letal geschädigter Neuroblasten.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Die mittlere Phagozytenfrequenz in strahlenexponierten Augenblasen betrug insgesamt das 1.2-fache des Kontrollwertes ($p < 0.005$). Bereits diese erste Zahl deutet darauf hin, dass das Erholungspotential des Augengewebes nicht in dem Masse ansteigt, wie angesichts der induzierten Nekrosevermehrung (2.5 mal höher als bei Kontrolle) zu erwarten wäre (Tabelle 29).

Besonders eindrücklich macht sich die äusserst geringe Mobilisierung phagozytärer Einheiten in dem stark geschädigten Ventralbezirk bemerkbar. Trotz massiver und extensiver Pyknose bei mehr als der Hälfte aller Präparate (Tabelle 21) liegt die durchschnittliche Makrophagenzahl dieser Zone nur im Kontrollbereich.

Obwohl in den restlichen Augenregionen mehr phagozytierende Zellen vorgefunden worden sind als bei den unbestrahlten Primordien (statistisch mit $p < 0.005$ gesichert), sind in Anbetracht des Zerstörungsausmasses in denselben Abschnitten diese Zunahmen doch als sehr gering zu bezeichnen. Zum Beispiel traten auch bei stärkster Schädigung der Distalregion nie mehr als drei Phagozyten auf.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass 4 Stunden nach Behandlung die Elimination der Zellüberreste noch nicht weit fortgeschritten ist. Es stellt sich die Frage, ob zur Aktivierung einer grösseren Zahl von Phagozyten ein bestimmter Schwellenwert bezüglich des Nekroseanteils überschritten werden muss oder aber die registrierte Makrophagenrate vom Organismus als ausreichend für die Gewebserholung "betrachtet" wird.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die Potenzierung des strahleninduzierten Zelltodes durch das Zytostatikum bewirkte gleichzeitig auch eine Steigerung der Phagozytenrate gegenüber der alleinigen Bestrahlung. Im gesamten Primordium wie auch im ventralen Bereich traten mehr als doppelt soviele Makrophagen auf wie bei der Referenzgruppe (Tabelle 29). Ebenfalls wies die präsumptive Retina eine signifikante Vermehrung der Häufigkeit von Phagozyten um einen Faktor von 1.7 auf.

Freilich darf nicht unerwähnt bleiben, dass rein numerisch der Anteil an Makrophagen demjenigen an Nekrosen klar unterlegen ist. Dies soll anhand eines Vergleichs der Maximalwerte der beiden Kriterien verdeutlicht werden. So wurden folgende Höchstwerte für Zelltod ermittelt: Gesamte Anlage 262, ventrale Region 160 und distale Zone bis 71 Nekrosen pro Schnittpräparat. Für die gleichen Auswertungsbereiche wurden maximal jedoch nur 19, 12 und

5 Phagozyten gezählt. Andererseits ist in Betracht zu ziehen, dass einzelne Fresszellen bis 10 Pyknosen aufnehmen können und somit bei genügend grosser Zahl eine beträchtliche Eliminierungskapazität der betroffenen Gewebspartie entwickelt werden kann.

Diese Befunde lassen darauf schliessen, dass angesichts der gesteigerten Strahlennekrose nach Kombinationsbehandlung die Abwehrreaktion des Augenprimordiums stärker aktiviert worden ist als nach Bestrahlung allein.

2.4.2 Untersuchungen 12 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Das Auftreten von Phagozyten während der Augenentwicklung ist äusserst stark *positiv* korreliert mit demjenigen des morphogenetischen Zelltodes. Insbesondere für die Auswertungsbe-
reiche "Gesamte Anlage" und "Augenstiel" besteht praktisch ein *funktioneller* Zusammenhang zwischen den beiden Kriterien ($r > 0.8$, siehe Tabelle 26).

Mit durchschnittlich 6.6 Phagozyten pro Schnitt weist das Primordium eine doppelt so hohe Inzidenz von Fresszellen auf als das frühere Entwicklungsstadium. Auch in den viele Nekrosen enthaltenden Regionen des Augenstiels und der Retina vermehrte sich die Makrophagenzahl gegenüber dem 4 Stunden-Intervall um einen Faktor von 1.6 bzw. 3.5. Die nur wenige tote Zellen aufweisenden Pigmentzone und Linsenplakode zeichnen sich dementsprechend auch durch nur geringe phagozytäre Aktivität aus (Tabelle 31).

Applikation von Vindesin allein.

Gleichzeitig mit der erhöhten zytotoxischen Wirkung des Chemikaliums fand sich auch eine grössere Zahl phagozytierender Zellen. Sowohl gesamthaft wie auch für die einzelnen Auswertungsregionen sind die Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollwerten statistisch gesichert.

Im Abschnitt "Zelltod" wurde die Potenzierung der spontanen Nekrose durch Vindesin beschrieben. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob auch Phagozytose als Erholungsprozess gleichermassen gesteigert worden ist. Am besten lässt sich dieser Aspekt anhand eines Vergleichs der für die beiden Kriterien erhaltenen Potenzierungsfaktoren klären:

Gesamte Anlage:	Zelltod	1.9,	Phagozytose	1.7	
Augenstiel	:	"	1.8,	"	1.6
Retina	:	"	1.9,	"	1.7
Pigmentzone	:	"	3.8,	"	3.0
Linsenplakode	:	"	2.3,	"	2.0

Diese Gegenüberstellung zeigt, dass der Potenzierungsgrad der Eliminationsaktivität des Embryonalgewebes ungefähr demjenigen des Zelltodes entspricht.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Wie bereits erwähnt wurde, ist 4 Stunden nach Bestrahlung die Phagozytenfrequenz nicht in dem Masse angestiegen, wie man dies angesichts der massiven Zellverluste erwartet hätte. Aus diesem Grunde war es von besonderem Interesse zu erfahren, ob das Augenprimordium in der Lage sein würde, die überschüssigen Nekrosen zu entfernen.

Da 12 Stunden nach Exposition eine vollständige Erholung des Embryonalgewebes registriert wurde, musste in der Zwischenzeit in den betroffenen Augenpartien eine verstärkte Abräumungstätigkeit erfolgt sein. Die durchschnittlichen Makrophagenzahlen liegen zwar höher als 4 Stunden nach Bestrahlung, weichen jedoch nicht signifikant von den Kontrollwerten ab.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die Resultate hinsichtlich des Kriteriums Phagozytose sind in vielfacher Weise mit jenen vergleichbar, welche bereits die Analyse des induzierten Zelltodes hervorbrachte. So ist der Ertrag an Makrophagen nach kombinierter Behandlung gegenüber Bestrahlung allein im gesamten Primordium und im Augenstiel signifikant erhöht, im Vergleich zur Einzelapplikation von VDS hingegen überall signifikant herabgesetzt.

Diese Befunde entsprechen dem positiven Korrelationsmodus zwischen den beiden Untersuchungskriterien (siehe Tabelle 32). Während jedoch nach Kombinationsbehandlung die Zunahme der spontanen Nekroserate in allen Auswertungsbereichen ausser der Retina statistisch gesichert war, ist die Phagozytenfrequenz einzig im Augestielbereich signifikant höher als in der unbehandelten Gruppe. Somit unterdrücken die Röntgenstrahlen im Kombinationsexperiment nicht nur die zytotoxische Wirkung des Alkaloids, sondern auch das Auftreten von Fresszellen. Es wäre auch möglich, dass angesichts des verminderten Nekroseanteils gegenüber VDS allein

eine geringere Zahl von Phagozyten benötigt wird.

2.4.3 Untersuchungen 24 Stunden nach Behandlung

Kontrolle.

Gleich wie 12 Stunden zuvor ist auch zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Häufigkeit phagozytischer Zellen überall in der Anlage stark positiv korreliert mit dem Nekrotisierungsgrad des Primordialgewebes. Insbesondere der Augensiel und die Retina zeichnen sich durch extrem hohe Korrelationskoeffiziente der beiden Kriterien aus (Tabelle 34).

Es ist bemerkenswert, dass in den unbehandelten Augenbechern die mittlere Makrophagenzahl mit 8.9 pro Schnitt höher ausgefallen ist als beim früheren Untersuchungsintervall (6.6 Phagozyten/Schnitt), und dies obwohl der Degenerationsanteil gegenüber dem jüngeren Stadium vermindert worden ist.

Was die einzelnen Augenstrukturen anbelangt, so ist die Abräumungsaktivität innerhalb derselben eher als gering einzustufen. Durchschnittlich findet man in jeder Auswertungszone, entsprechend der relativ kleinen Nekrotopulation, lediglich zwei Fresszellen (Tabelle 33). Einzig die zukünftige Linse weist ein wenig höhere Makrophagenzahl auf als die übrigen Augenabschnitte (3 Phagozyten pro Schnitt). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die Säuberungseinheiten innerhalb des letztgenannten Evaluationsbezirks meist sehr konstant lokalisiert sind, nämlich im Bereiche der ventralen und dorsalen Invaginationsstelle, wo in der Regel auch die meisten Pyknosen angetroffen werden. Charakteristisch für die Linsengrube ist auch, dass diese nur sehr wenige "freie" Nekrosen enthält, praktisch alle tote Fragmente befinden sich innerhalb phagozytischer Zellen.

Allgemein zusammengefasst zeigte sich auch 24 Stunden nach Bestrahlung eine Abhängigkeit des Auftretens phagozytärer Elemente vom Anteil an programmierten Zelltod in bestimmten Gewebsabschnitten. So ist im Vergleich zum früheren Entwicklungsstadium die Makrophagenzahl des Augensiels dem verringerten Nekrotisierungsgrad entsprechend auf die Hälfte gesunken. Umgekehrt kam es bei den differenzierteren Regionen des Augenpigments und der Linse mit erhöhter Degenerationsrate auch zur grösseren Aktivierung der Eliminierungszellen (vergleiche Tabellen 33 und 31).

Applikation von Vindesin allein.

Übereinstimmend mit dem positiven Zusammenhang zwischen Phagozytose und Zelltod verzeichneten alle Auswertungsbereiche mit signifikanter Nekroserieigerung auch eine statistisch gesicherte Zunahme der Makrophagenzahl gegenüber Kontrolle. Das Augenprimordium enthält im Durchschnitt 14 Fresszellen (56 % mehr als Referenzanlage), wovon auf die beiden Abschnitte der Retina und Linse je etwa 1/3 entfallen.

Werden die erhaltenen Daten mit jenen der unbehandelten Gruppe verglichen, so ergibt sich einzig für die zukünftige Netzhaut eine dem induzierten Degenerationsanstieg entsprechende Vermehrung phagozytärer Einheiten (2,3-fache des Kontrollwertes). Weder innerhalb des Linsenbeckers noch in der Pigmentzone vermehrte das Zytostatikum die Inzidenz von Abräumungszellen in dem Masse, wie dies bezüglich des Anteils an toten Neuroblasten beobachtet worden ist. So wurde nach VDS-Zugabe die spontane Nekroserie in den zuletzt erwähnten Regionen um 70 bzw. 80 % erhöht, während die Zahl der Phagozyten nur um 50 respektive 30 % zunahm (vergleiche Tabellen 26 und 33). Da jedoch die Aufnahmekapazität der Fresszellen recht gross ist (ein Phagozyt verdaut bis zu 10 Pyknosen), kann sich das Embryonalgewebe wahrscheinlich selbst bei relativ geringer Makrophagenzahl vom überschüssigen Zelltod befreien.

Bestrahlung mit 0.9 Gy.

Im Einklang mit den auf Kontrollebene liegenden Nekroserieaten unterscheiden sich auch die ermittelten Phagozytenzahlen nicht signifikant von den Referenzwerten. Da die Häufigkeit der Fresszellen *gleichsinnig* mit jener vom Zelltod korreliert ist, wurden beispielsweise im Augensiel und in der Retina nicht nur die mittleren Zelltodfrequenzen, sondern auch die Makrophagenanteile gegenüber der unbehandelten Gruppe ein wenig herabgesetzt. Es ist bemerkenswert, dass auch in der Pigmentzone und Linsengrube die Phagozyten nicht zahlreicher auftraten als bei der Kontrolle, und dies obwohl die Nekroseriepopulation in den beiden Regionen durch die Bestrahlung erhöht worden ist (vergleiche Tabellen 26 und 33). Offensichtlich liegt eine geringfügige Vermehrung spontaner Zelltodrate noch innerhalb des embryonalen "Toleranzbereichs" und bewirkt deswegen keine verstärkte Mobilisierung der Eliminationseinheiten.

Kombinierte Applikation von VDS und Strahlen.

Die Resultate der Häufigkeitsanalyse phagozytischer Zellen nach Kombinationsbehandlung

lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die nach alleiniger Bestrahlung im Kontrollbereich liegenden Phagozytenzahlen wurden durch die kombinierte Anwendung beider Agenzien noch zusätzlich erniedrigt. Sowohl im gesamten Primordium wie auch in den Regionen des Augenpigments und der Linse sind die Makrophagenanteile signifikant kleiner als bei den unbehandelten Referenzzonen (Tabelle 33).
- Gemäss der positiven Korrelation der Kriterien Phagozytose und Zelltod müsste zumindest in der präsumptiven Netzhaut (fast 40 % höhere Nekroserate als Kontrolle) die Eliminationsaktivität embryonaler Zellen verstärkt sein. Die Untersuchung zeigte jedoch, dass auch in diesem Gebiet die Phagozytenfrequenz nur dem Normalwert entspricht.

Allgemein betrachtet bestätigen die vorliegenden Befunde die bereits 12 Stunden zuvor gewonnenen Erkenntnisse, nämlich dass Röntgenstrahlen nicht nur die Zytotoxizität des Chemikaliiums unterdrücken, sondern auch das Auftreten von Phagozyten. Im Unterschied zum früheren Untersuchungsintervall wurden die nach alleiniger Vindesin-Zugabe erhöhten Makrophagenzahlen durch Nachbestrahlung nicht nur auf Kontrollebene gebracht, sondern stellenweise sogar noch unterhalb dieser. Zudem hat sich gezeigt, dass eine verstärkte Aktivierung embryonaler Fresszellen erst nach Ueberschreiten eines bestimmten Schwellenwertes an Zelltod stattfinden muss. So enthielt die primordiale Retina beider Entwicklungsstadien bei durchschnittlich 24 Pyknosen (signifikant mehr als unbehandelte Zone) nie mehr als die dem Kontrollwert entsprechende Zahl von 2 Phagozyten pro Schnitt (vergleiche Tabellen 31 und 33).

IV. DISKUSSION

1. Makroskopische Befunde

Embryotoxizität von Vindesin und verwandten Vinca Alkaloiden

Die makroskopische Analyse der Mausefeten gegen Ende der Pränatalperiode zeigte, dass in trächtige Mütter injiziertes Vindesin während der Organogenese diaplazental auf den Embryo übergehen und dessen Normalentwicklung beeinträchtigen kann. Dabei waren um ein Mehrfaches geringere Dosen als bei den Adulten bereits toxisch für die Embryonen. So betrug die höchste in den Experimenten applizierte Konzentration von VDS (1.0 mg/kg) lediglich 1/6 der DL50 bei der adulten Maus (6.3 mg/kg, TODD et al., 1976) und bewirkte dennoch am Tag 9 der Gestation das Absterben sämtlicher Implantate. Bei den Muttertieren liessen sich hingegen keine Intoxikationszeichen wie Vitalitätsverminderung, Verhaltensstörungen oder pathologische Organveränderungen feststellen. Die besondere Sensibilität vorgeburtlicher Organismen auf externe Noxen hat sich somit auch in vorliegender Studie bestätigt.

Aus den ermittelten qualitativen und quantitativen Daten geht hervor, dass die Reaktionsart wie auch das Schädigungsausmass vom Behandlungszeitpunkt und von der Konzentration des Alkaloids abhängig sind.

Stadiumspezifische Unterschiede

Die stadiumspezifischen Unterschiede in der embryotoxischen Wirksamkeit des Vindesins während der frühen Organogenese sind, insbesondere bezüglich der postimplantativen Verluste, beträchtlich. Generell reagiert das *ältere* Entwicklungsstadium (Tag 9) deutlich empfindlicher auf VDS als das *jüngere* (Tag 8). So führte beispielsweise eine Behandlung mit 0.5 mg/kg Vindesin am Tag 9 zu einer doppelt so hohen Sterblichkeitsrate wie 24 Stunden zuvor. Markante Empfindlichkeitsdifferenzen bestehen auch hinsichtlich nicht-embryoetaler Eigenschaften der Substanz. Im Vergleich zum weniger fortgeschrittenen Stadium vergrössert sich nach Applikation von 0.35 mg/kg VDS der Anteil an morphologisch abnormen (d.h. retardierten und missgebildeten) Feten um das Doppelte, derjenige an Wachstumsretardierten gar um das 2.8-fache.

Obwohl teratogene Effekte an keinem Behandlungstag signifikante Ausmasse erreichen, lassen sich (zumindest qualitativ) auch in bezug auf dieses Kriterium stadiumspezifische Unterschiede feststellen. So induziert Vindesin Mikrotie (verkleinerte Ohren) ausschliesslich am Tag 8, während Anomalien wie Mikrophthalmie und vor allem Hypodaktylie einzig ein Tag später

produziert wurden. Die Hypodaktylie ist übrigens weder nach Applikation von Vincristin noch von Vinblastin gefunden worden.

Die erhöhte Toxizitätswirkung des Antimitotikums Vindesin am Tag 9 könnte mit dem besonders beschleunigten Ablauf der Organogenese und der damit verbundenen Erhöhung zellulärer Vermehrungsaktivität zusammenhängen (RUGH, 1968). Auch FRAENZ (1971) betont die maximale Steigerung der Zellteilungsrate am Tag 8 und 9 der Mausentwicklung. Da der Anteil an proliferierenden Zellen in gewissen Blastemen oder Organanlagen höher ist als in anderen, könnte die verstärkte Schädigungspotenz des Zytostatikums am Tag 9 mit dem vermehrtem Auftreten solcher mitotisch aktiven Zonen zusammenhängen. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, dass zum gegebenen Zeitpunkt die entscheidenden morphogenetischen Prozesse (u.a. Entstehung des Gehirns und der Sinnesorgane) ablaufen (RUGH, 1968).

FERM (1964) konnte beim Hamster eine Korrelation zwischen massivem Fetalsterben und Mitoschemmung durch Vincristin nachweisen. Es stellt sich somit die Frage, ob die starke Letalitätswirkung von Vindesin am Tag 9 auf dessen zellteilungshemmende Eigenschaft zurückgeht. Die Unterdrückung des Normalwachstums durch das Pharmakum könnte ebenfalls mit diesem Phänomen in Verbindung gebracht werden (SAXEN, 1976), wobei auch noch andere Störungen berücksichtigt werden müssen (SCOTT, 1977).

Die Untersuchungen stadium-abhängiger Embryotoxizitätswirkungen von verwandten Vinca Alkaloiden (Vincristin und Vinblastin) lieferten keine Hinweise betreffend der spezifischen Empfindlichkeit des Maus-Embryos am Tag 9 der Gestation. JONEJA und LELIEVER (1974) injizierten *Vinblastin* während der Früh- bis Spätorganogenese (Tag 7-11 p.c.) und fanden die höchsten Schädigungsraten nach Behandlung am Tag 8. Wurde *Vincristin* kurz nach der Implantation und zu Beginn der Organogenese (Tag 6-8) verabreicht, so stellte sich Tag 7 als das empfindlichste Stadium heraus.

Somit entfaltet Vindesin seine grösste Effektivität *später* in der Organogenese als die übrigen Pflanzenalkaloide. Erschwert wird allerdings der Vergleich der eigenen Daten mit Befunden anderer Autoren wegen der Benützung unterschiedlicher Mäusestämmen, sowie teilweise verschiedenen Dosierungen der Zytostatika.

Dosis-Wirkung-Beziehungen

Am Tag 9 löst Vindesin im Prinzip nur 2 Reaktionen aus, nämlich Wachstumsretardation und Postimplantationstod, wobei im niedrigeren Dosierungsbereich (0.35 mg/kg) einzig eine

Reduktion der Körpergrösse erfolgt. Bereits eine unwesentliche Steigerung der Konzentration (auf 0.5 mg/kg) bewirkt das Absterben der meisten Nachkommen, so dass die wenigen abnormen Ueberlebenden statistisch kaum ins Gewicht fallen. Somit ergibt sich für das Kriterium "Mortalität" keineswegs eine lineare Dosis-Effekt-Beziehung. Um den genauen Schwellenwert betreffend dieses Kriteriums zu eruieren, müsste zwischen 0.5 und 0.35 mg/kg VDS eine noch feinere Dosis-Abstufung vorgenommen werden.

Wie bereits erwähnt wurde, ist die Toxizität des Alkaloids am Tag 8 im Vergleich zum älteren Entwicklungsstadium erheblich vermindert. So besteht nur eine statistisch signifikante Wirkung von 0.35 mg/kg VDS gegenüber der Kontrolle, wenn die Anteile an missgebildeten und retardierten Feten addiert werden.

Die Abgabe von 0.5 mg/kg Vindesin führt sowohl zu postimplantativen Verlusten wie auch zu Entwicklungsstörungen. Da über 60 % der Nachkommen die Behandlung überleben, erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von morphologischen Defekten. Ähnlich wie am Tag 9 beschränkt sich aber die nicht-letale Wirkung des Zytostatikums auf eine Unterdrückung des Normalwachstums. Die erhöhte Zahl entwicklungsretardierter Feten ist massgeblich beteiligt an der signifikanten Zunahme der Abnormitätsrate auf das 5.7-fache des Kontrollwertes.

Nach Verabreichung der höchsten Konzentration von VDS sinkt der Anteil an Ueberlebenden auf 36 %. Da ausser Fröhrtod keine andere embryotoxische Reaktion gesehen wurde, muss in diesem Falle eine Alles-oder-Nichts Wirkung des Chemikaliums angenommen werden. Somit bestehen Parallelen zu den nach Injektion von 0.5 mg/kg Vindesin am Tag 9 erhaltenen Ergebnissen (entweder Resorption der Implantate oder ungestörte Normogenese). Diese Befunde bestätigen die Aussage von HUGHES (1976), dass bei einer hohen Dosierung eines Agens in der Regel einzig letale Effekte zu erwarten sind.

Warum bestimmte Würfe oder Individuen hohe Konzentrationen einer Substanz überstehen, während andere zugrunde gehen, kann nur vermutet werden. Von Bedeutung ist sicherlich der Entwicklungszustand einzelner Würfe zum Behandlungstermin. Da bereits der Befruchtungszeitpunkt unterschiedlich ist (siehe Abschnitt Material und Methoden), trifft das an verschiedene Muttertiere abgegebene Chemikalium kaum stets auf die gleichen Entwicklungsstadien. Dabei beträgt die Dauer einer "kritischen Periode" (d.h. die Zeitspanne einer maximalen Empfindlichkeit des Embryos auf den jeweiligen Behandlungsmodus) oft nur wenige Stunden. Innerhalb des gleichen Wurfes können zudem bestimmte Individuen auf grund ihrer genetischen Prädisposition empfindlicher auf eine Noxe reagieren als andere (NEBERT und BIGELOW,

1982).

Ein auffallender Unterschied zwischen Vindesin und den verwandten Pflanzenalkaloiden besteht in seiner geringen teratogenen Aktivität an den beiden Gestationstagen. Dabei wird die frühe Organogenese als die empfindlichste Periode hinsichtlich durch Noxen induzierbarer Missbildungen betrachtet (BECKMAN und BRENT, 1984). Bemerkenswert ist insbesondere die mangelnde Sensibilität des präsumptiven Neuralgewebes auf das Zytostatikum. Missbildungen des ZNS und vor allem der Augen nach Applikation von Vincristin oder Vinblastin während der Frühorganogenese wurden bei der *Maus* (JONEJA und UNGTHAVORN, 1969; JONEJA und LELIEVER, 1974; SIEBER et al., 1978; SVOBODA und O'SHEA, 1984), bei der *Ratte* (DE MYER, 1964, 1965; COHLAN et al., 1965; TAMAKI et al., 1967), und beim *Hamster* (FERM, 1963) in wechselnder Häufigkeit beobachtet. Demgegenüber treten nach Abgabe von Vindesin Anomalien schwereren Ausprägungsgrades (wie Exenzephalie) höchst selten auf. Ausnahme bildet die gesteigerte Frequenz an Wolfsrachen (11.6 % gegenüber 3.3 % bei der Kontrolle) nach 0.5 mg/kg VDS am Tag 9, wobei die Differenz zur unbehandelten Gruppe statistisch nicht signifikant ist.

Das Ausbleiben von Hirn- und Augenschäden nach VDS-Applikation hängt vermutlich mit der wechselnden Empfindlichkeit neuraler Zellvorstufen während bestimmter Perioden der Pränatalentwicklung zusammen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen beobachteten SIEBER et al. (1978) keine teratogenen Veränderungen des Hirns und der Augen nach Applikation von VCR am Tag 8 der Mausgestation. Hingegen wurden nach Behandlung am Tag 6 und 7, trotz des Fehlens jeglicher Neuralstrukturen zum Expositionszeitpunkt, Missbildungen der erwähnten Organe registriert. Auch nach Verabreichung von Vinblastin am Tag 8 erwies sich das ZNS als unempfindlich, während Umbilikalhernien in vermehrer Masse auftraten (JONEJA und LELIEVER, 1974). Die Stadiumspezifität des Missbildungsspektrums wurde ebenfalls bei der Ratte nachgewiesen (TAMAKI et al., 1967). So bewirkt Vincristin am Tag 10 keine Augen- und Hirnschäden, während Exenzephalie (am Tag 8) und Mikrophthalmie (am Tag 8 und 9) zum früheren Zeitpunkt der Organogenese induziert werden.

Anscheinend hängt die teratogene Wirkung der Vinca Alkaloide auf das Neuralgewebe mit der Sensibilität bestimmter Stammzellen zusammen. Die Anreicherung der Substanz in diesen Zellvorstufen ist für die Induktion von Anomalien von grösserer Bedeutung als das Auftreten der betreffenden Organanlagen zum Applikationstermin (PERSAUD, 1979).

Für diese These sprechen auch unsere eigenen Ergebnisse. Obwohl Tag 9 der Mausentwicklung

eindeutig im Zeichen der Gehim- und Augenausbildung steht, wird statt der Normogenese dieser Organe diejenige der Extremitäten beeinträchtigt. Das vermehrte Auftreten von Hypodaktylie deutet darauf hin, dass die Gliedmassen (resp. deren Stammzellen) schon sehr früh in der Entwicklung geschädigt werden können. Ähnlich produziert Vindesin am Tag 8 in vermehrtem Masse Polydaktylie, obwohl zum Behandlungszeitpunkt noch keine Extremitätenanlagen vorliegen.

Dass schwere Anomalien zahlenmässig so selten sind, muss nicht unbedingt durch eine mangelnde Empfindlichkeit des Primordialgewebes auf das Zytostatikum bedingt sein. Möglicherweise sterben Implantate mit lebensbedrohlichen Organschäden schon früh nach Behandlung ab und werden im Verlaufe der Gestationsperiode resorbiert. Dies würde die stark angestiegenen Mortalitätsraten nach Applikation höherer VDS-Konzentrationen erklären.

Interessanterweise zeigt ein anderes Zytostatikum, nämlich Cis-Platin, ähnliche embryotoxische Eigenschaften wie Vindesin (KOEPPF-MAIER et al., 1985). Wird Cis-Platin während der frühen Organogenese der Maus (Tag 8 und 10) verabreicht, so bleiben teratogene Effekte aus. Hingegen erhöhen sich die Häufigkeiten von postimplantativen Verlusten und Wachstumsretardationen. Solche Ergebnisse werden von den Autoren mit unterschiedlichen Ursachen der Entwicklungsstörungen durch Chemikalien begründet. Das Fehlen von Missbildungen wird auf die Wirksamkeit der Plazentalbarriere zurückgeführt, während für die übrigen Effekte die Störung des mütterlichen hormonalen Metabolismus verantwortlich ist.

Bei der Analyse der embryotoxischen Eigenschaften der Vinca Alkaloide erwies sich die Plazenta einzig während der späten Organogenese bzw. Fetogenese der Maus (Tag 12-17) als eine effiziente Schranke, denn trotz der extrem hohen Dosierung (5 mg/kg) induzierte Vincristin keine makroskopisch sichtbaren Schäden (NOACK, 1972). Die verringerte Empfindlichkeit späterer Entwicklungsstadien auf das Alkaloid interpretiert der Autor mit der differenziellen Metabolisierung der Substanz durch das Muttertier.

Unsere Befunde scheinen weniger mit dem Plazentalfaktor als mit der Konzentration des Zytostatikums erklärbar zu sein. Bei einer niedrigen Dosierung von VDS kann eine *allgemeine* Proliferationshemmung zur abnormen Verkleinerung der Körpergrösse führen. Es ist zudem vorstellbar, dass die eingetretenen Zellverluste nicht ausreichen, um eine Missgestaltung oder gar den Tod der betroffenen Individuen zu bewirken. Auch das vermehrte Auftreten von Hypodaktylie basiert vermutlich auf einer, allerdings *lokal begrenzten*, Unterdrückung der Zellteilungsaktivität durch kleine Dosen (SAXEN, 1976). Von einer bestimmten Konzentration

an (0.5 resp. 1.0 mg/kg) kommt es schliesslich zur massiven Zerstörung ganzer Gewebepartien oder Organe, so dass zum Untersuchungszeitpunkt einzig resorbierte Nachkommen vorgefunden werden (FRAENZ, 1971). In Uebereinstimmung mit eigenen Resultaten beobachteten SIEBER und Mitarb. (1978) nach Applikation der höchsten VCR-Konzentration am Tag 8 bei den überlebenden Mausfeten (30 %) nur vereinzelte Missbildungen (Alles-oder-Nichts-Gesetz).

Betreffend der embryo-toxischen Eigenschaften des Vindesins bestehen mehr Parallelen zu der Stammsubstanz Vinblastin als zum antineoplastisch ähnlicheren Vincristin. So drückt sich die schädigende Wirkung von VBL auf die Pränatalentwicklung der Nagetiere ebenfalls hauptsächlich im Postimplantationstod aus (FERM, 1963; DE MYER, 1964; COHLAN et al., 1965; JONEJA und LELIEVER, 1974).

Stammspezifische Teratogenitätswirkung der Vinca Alkaloide

Nach Abgabe von Vincristin fanden JONEJA und UNGTHAVORN (1969) Exenzephalie nur bei Mausfeten des C3H-Stammes, während Mikrognathie, Syndaktylie und Umbilikalhernien bei den Nachkommen der DBA-Mütter auftraten. Ebenfalls als stammspezifisch erwies sich das Vorkommen von Hirnbruch und von Polydaktylie nach Vinblastin in den Untersuchungen von OHZU und SHOJI (1965). Es wäre zu prüfen, ob ein anderer als der hier verwendete NMRI-Stamm auf Vindesin nicht auch mit ZNS-Schäden reagieren könnte.

Embryotoxizität von ionisierenden Strahlen während der Organogenese

Die Ergebnisse der makroskopischen Analyse nach Röntgenbestrahlung mit 0.9 Gy am Tag 8 oder 9 der Schwangerschaft lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- das frühere Entwicklungsstadium reagiert deutlich sensibler auf die verabreichte Strahlendosis als der Embryo am Tag 9 der Gestation.
- die höhere Strahlenempfindlichkeit der Implantate am Tag 8 betrifft einzig die beiden Kriterien Abnormität und Teratogenität. Im Vergleich zum Tag 9 nahm der Anteil an morphologisch abnormen Feten (dazu zählen auch Wachstumsreduktionen) um einen Faktor von 2, derjenige an Missgebildeten sogar um einen Faktor von 4.5 zu.
- die teratogene Wirkung von Röntgenstrahlen am Tag 8 der Gestation konzentriert sich fast ausschliesslich auf die Region des zentralen Nervensystems (ZNS) und der Augen. Missbildungen des Gehirns (Hirnbruch, seltener auch Hydrozephalie) sowie Augendefekte (in

erster Linie Exophthalmie) dominieren in eindeutiger Weise das vorgefundene Anomalienspektrum.

Stadiumabhängigkeit der Strahlenwirkung

Bezüglich der Stadiumabhängigkeit der Strahlentoxizität stellt sich die Frage, warum bei zwei zeitlich so nah beeinander liegenden Behandlungsstadien (24 Stunden) dermaßen markante Empfindlichkeitsunterschiede auftreten können. Dazu sei bemerkt, dass in der Mausentwicklung, welche um ein Vielfaches kürzer ist als diejenige des Menschen, die Zeitdifferenz von einem Tag hinsichtlich des Differenzierungszustandes der Embryonalzellen sehr viel ausmachen kann. Bekanntlich verhält sich die Strahlenempfindlichkeit pränataler Organismen umgekehrt proportional zum Differenzierungsgrad der Zellen (FRITZ-NIGGLI, 1959; KALTER, 1968). Auch der proliferative und metabolische Zellstatus zum Bestrahlungstermin prägt die Sensibilität eines Entwicklungsstadiums (KAMEYAMA und HOSHINO, 1985).

Übereinstimmend mit den vorliegenden Daten führte eine intrauterine Röntgenbestrahlung von Mäusen mit 100 rad (1 Gy) am Tag 8 (RUGH et al., 1964) zu einer viel höheren Abnormitätsrate (21.5 %) als am Tag 9 der Gestation (1.4 %). Diese Beobachtungen werden mit der besonderen Anfälligkeit des Embryos auf kongenitale Missbildungen zu *Beginn* der Neurogenese gedeutet. OSTERTAG und HEINZMANN (1972) führen die ausgeprägte Strahlenempfindlichkeit des Gehirns am Tag 8 der Mausentwicklung darauf zurück, dass kein anderes Organ in zeitlich so schnell aufeinander folgenden Phasen eine derartige Evolution und Differenzierung durchläuft. Deshalb treffen ionisierende Strahlen auch bei geringen Unterschieden in Behandlungsterminen auf vollkommen verschiedene Differenzierungsvorgänge im Embryo.

Eine allgemein gültige Regel betreffend der Strahlenempfindlichkeit früher Stadien der Organogenese ist schwierig aufzustellen. Dies sei belegt anhand der Versuche von SAKURAI (1968), der zwei verschiedene Mäusestämme während der Organogenese (Tag 7-12 p.c.) einer Strahlendosis von 2 Gy aussetzte. Bei den am Tag 18 untersuchten ddN-Feten erreichte die Missbildungsfrequenz nach Bestrahlung am Tag 11 das Maximum von 87 %, während sich die Tage 8 und 9 diesbezüglich als gleich strahlenempfindlich erwiesen (55-58 %). Beim zweiten Stamm war die Schädigungsrate am Tag 9 hingegen deutlich höher als am Tag 8. Somit entscheidet neben der Dosierung auch die genetische Konstitution der Versuchstiere über die Strahlenempfindlichkeit der exponierten Entwicklungsstadien.

Reaktionsspezifität der Strahlenwirkung

Was die Reaktionsspezifität der Strahlenwirkung anbelangt, so fällt in unserer Studie das Ausbleiben von letalen und wachstumshemmenden Effekten auf. Dass die Zahl intrauteriner Postimplantationsverluste die Kontrollebene nicht überschreitet, hängt sicherlich mit der Höhe der applizierten Dosis (0.9 Gy) zusammen. So nimmt bei 18-tägigen Mausfeten die Mortalitätsrate nach Röntgenbestrahlung mit 1.75 Gy am Tag 9 stark zu (CEKAN und Mitarb., 1985). Auch MICHEL (1982) stellte 5 Tage nach Bestrahlung von NMRI-Mäusen am Tag 8 eine deutliche Steigerung der Resorptionsfrequenz (20.8 %) fest, allerdings erst nach Anwendung der hohen Dosis von 1.8 Gy. Zudem verringert sich die Empfindlichkeit in bezug auf Strahlentod mit zunehmendem Gestationsalter, am Tag 11 wirkt sich die gleiche Dosis nur noch auf 10 % der Implantate letal aus.

Demgegenüber kann das Fehlen von Wachstumsreduktionen dadurch erklärt werden, dass diese Reaktion am ehesten nach Strahlenexposition während der frühen Fetogenese ausgelöst wird (BRENT, 1979). In Übereinstimmung mit unseren Daten erzielte BRENT (1970) keine Verminderung der Geburtsgewichte nach einer Bestrahlung mit 0.9 Gy am Tag 8, im Gegensatz zur Behandlung am Tag 12 der Gestation.

Von Bedeutung ist ebenfalls der *Untersuchungszeitpunkt*. MICHEL (1977, 1981) bestrahlte NMRI-Mäuse am Tag 8 mit der kleinen Dosis von 1 cGy (1 rad) und untersuchte die Nachkommen am Tag 13 resp. am Tag 18. Während beim früheren Examinationszeitpunkt 17 % der Implantate eine verringerte Körpergrösse zeigten, sank der Anteil an wachstumsgehemmten Feten am Tag 18 auf 3 % ab. Somit kann ein anfänglich vorhandener Entwicklungsrückstand mit Hilfe der Regenerationskapazität bis zu Ende der Gestationsperiode aufgeholt werden. Möglicherweise trifft dies auch für unsere Untersuchungen zu, da sich insbesondere während der Organbildungsphase der Embryo durch eine ausgeprägte Erholungspotenz auszeichnet.

Eine besondere Aufmerksamkeit verdient die Problematik der strahlenbedingten ZNS- und Augenstörungen. Morphologische (und damit auch funktionelle) Defekte des Gehirns und der Sinnesorgane gehören eindeutig in die Sparte der vitalitätsvermindernden oder (wie z.B. im Falle der Exenzephalie) sogar zu den letalen Strahlenschäden. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen erwies sich die Strahlenempfindlichkeit des embryo-fetalen Neuralgewebes als strikt stadiumspezifisch. So betrug der Anteil an Hirnschäden nach Behandlung am Tag 8 das mehr

als 4-fache desjenigen nach Exposition des älteren Entwicklungsstadiums. Die Induktion von Augenanomalien war sogar vollständig auf den früheren Expositionstermin beschränkt. Dies, obwohl die Differenzierung des Gehirns und der Augen eigentlich erst am Tag 9 beginnt (Anlagen des Prosencephalons, Diencephalons, Augenblasen).

Damit wird die Behauptung von PIZARELLO und WITCOFSKI (1982) widerlegt, dass Missbildungen bestimmter Organe normalerweise zum Zeitpunkt erster morphologischer Anzeichen deren Differenzierung ausgelöst werden. Auch die Aussage von KRIEGL UND SHIBATA (1964) wird nicht bestätigt, dass die Strahlenempfindlichkeit der Augen während des Wachstums der Augenblasen (Tag 9 der Mausentwicklung) am grössten ist. MURAKAMI (1968) bestrahlte Mäuse während der Organogenese (Tag 7-11) mit 2 oder 3 Gy und registrierte bei 18-tägigen Feten ebenfalls viel häufiger Hirnbruch oder Augenanomalien nach Exposition früherer Stadien (Tag 7 und 8) als am Tag 9.

Der Grund, warum die Schädigung des Nervensystems die häufigste Reaktion auf die pränatale Bestrahlung darstellt, liegt vermutlich in der frühen Differenzierung des Gehirns sowie in der extremen Strahlenempfindlichkeit der Neuroblasten (RUGH, 1971). Diese Vorstufen der Neurone sprechen nicht nur auf kleine Strahlenmengen an, sondern repräsentieren gleichzeitig den am meisten verbreiteten Zelltypus im Embryo. Aus unseren Befunden geht hervor, dass die Neuroblasten am Tag 8 der Gestation bedeutend strahlenempfindlicher sind als 24 Stunden später.

Dass das *Neuralgruben-Stadium* eine besonders risikoreiche Periode hinsichtlich strahleninduzierter Exenzephalien darstellt, belegen auch die Untersuchungen von HICKS und D'AMATO (1966). Die ionisierenden Strahlen können nämlich das vorgeplante Schliessen der beiden Neuralwülste verhindern und dadurch einen Hirnbruch hervorrufen. Nach dem Verschluss der Neuralwülste (Tag 9 der Gestation) verringert sich darum die Gefahr des Auftretens dieser schweren Abnormitätsform.

Mögliche Mechanismen des vorgefundenen Missbildungsmusters

Da bei unseren Untersuchungen die ZNS-Schäden während des Neuralgruben-Stadiums induziert worden sind, handelt es sich dabei nach MURAKAMI (1968) um *indirekte Strahlenwirkungen*. Darunter versteht man Wirkungen von Strahlen auf das Induktionssystem, auf die Stammzellen der zukünftigen Organe oder auf das Primordium vor dessen Entstehung.

KAMEYAMA und HOSHINO (1985) sprechen von 2 kritischen Perioden der Organogenese. Die erste ist charakterisiert durch das Schliessen des Neuralrohrs in kranialen und kaudalen Abschnitten, die zweite durch die Teilung des Vorderhirns in die beiden Grosshirnbläschen.

Falls ionisierende Strahlen die Vorgänge während der ersten Periode beeinträchtigen, können Hirnbrüche resultieren. Störungen im Verlaufe der zweiten Periode führen zu Holoprosenzephalie. Das vermehrte Auftreten von Exenzephalien nach Exposition am Tag 8 spricht für eine strahlenbedingte Beeinträchtigung der Neurogenese während der erstgenannten Entwicklungsphase.

Wechselwirkungen zwischen Vindesin und Röntgenstrahlen bezüglich grob-morphologischer Entwicklungsstörungen

Die Analyse von Kombinationswirkungen am Tag 18 der Gestation zeigte die Abhängigkeit der Interaktionsmodi vom Behandlungsstadium, von der Konzentration des Chemikaliums sowie vom Untersuchungskriterium.

Die Frage, ob und unter welchen Umständen *synergistische* (über-additive) Wechselwirkungen zwischen Vindesin und Röntgenstrahlen zustande kommen, interessierte besonders. Im *nicht-toxischen* Dosierungsbereich des Alkaloids (0.25 und 0.35 mg/kg) lässt sich eine supra-additive Reaktionsverstärkung mit ionisierenden Strahlen einzig nach der Kombination von 0.35 mg/kg Vindesin und 0.9 Gy Röntgenstrahlen am Tag 8 der Gestation feststellen. Betroffen werden alle Untersuchungsparameter ausser der Wachstumshemmung. Am wenigsten wird die Additivitätsebene in bezug auf die Letalität, am höchsten hinsichtlich der Abnormität überschritten. Somit vermag Vindesin am Tag 8 nur in einem äusserst schmalen Dosierungssektor den Strahlenschaden auf eine synergistische Interaktionsweise zu potenzieren.

Was den Interaktionsindex nach ROTHMAN (1974) anbelangt, scheint es, dass zur Bestimmung des Synergismus-Ausmasses anstatt eines Quotienten aus dem beobachteten Kombinationswert und der erwarteten Summe der Einzelwirkungen besser die Differenz zwischen den beiden Werten beigezogen werden sollte. Dies sei am folgenden Beispiel demonstriert: die Quotienten für die Kriterien Abnormität und Letalität nach Applikation von 0.35 mg/kg VDS und 0.9 Gy am Tag 8 betragen 1.54 resp. 1.61, obgleich im zweiten Fall der Unterschied zur Additivitätsgrenze lediglich halb so gross ist wie derjenige für nicht-letale Embryonalschäden.

Die Abhängigkeit der Interaktionsweise von der Konzentration des Zytostatikums drücken auch die auf eine *Additivität* der Einzelwirkungen hinweisenden Kombinationswerte nach Anwendung der tiefsten VDS-Dosis (0.25 mg/kg) und Röntgenstrahlen am Tag 8 aus. Geht man von der Tatsache aus, dass die Toxizitätswirkungen von Vindesin und von Röntgenstrahlen auf

verschiedene zelluläre Ursachen zurückzuführen sind, so müsste nach STREFFER und MUELLER (1984) eigentlich von einer *Heteroaddition* gesprochen werden. Additive Effekte repräsentieren nach VALERIOTE und LIN (1975) den zu erwartenden Reaktionsmodus bei zwei auf verschiedene Zellzyklus-Phasen wirkenden Agenzien.

Weiterhin zeigte die makroskopische Analyse, dass das Zytostatikum als ein wirksamer Strahlensensibilisator agieren kann. Unter dem Begriff der Sensibilisierung versteht man im allgemeinen eine Erhöhung der Strahleneffektivität durch die Zugabe einer Substanz, die selber unwirksam ist (UNSCEAR 1982; STREFFER und MUELLER, 1984; FU, 1985). Diese Bedingungen (Vindesin als ein inaktives Agens) erwiesen sich als erfüllt für die kombinierte Anwendung von 0.25 resp. 0.35 mg/kg VDS und Bestrahlung am Tag 8 der Gestation in bezug auf das Kriterium "Teratogenität". Die strahleninduzierte Missbildungsrate wurde durch 0.25 mg/kg VDS um einen Faktor von 1.7, durch 0.35 mg/kg VDS hingegen sogar um einen Faktor von 2.4 gesteigert. Nach Vorbehandlung mit 0.35 mg/kg VDS erhöhte sich ausserdem der Anteil an Hirn- und Augenschäden gegenüber der bestrahlten Gruppe um einen Faktor von 2.1 bzw. 1.7.

Höhere Vindesin-Konzentrationen (0.5 und 1.0 mg/kg) verstärken den Strahlenschaden nicht mehr. Die Kombinationseffekte entsprechen entweder der Toxizitätswirkung des Chemikali-ums oder der Bestrahlung allein. Diese Befunde bestätigen die Aussage von STREFFER und MUELLER (1984), dass das strahlensensibilisierende Vermögen eines Chemikali-ums auf niedrige Dosierungen beschränkt bleibt.

Stadiumabhängigkeit von synergistischen Wechselwirkungen

Ob ein chemisches Agens in niedrigen oder in höheren Konzentrationen sensibilisierend wirkt, ist letztlich auch eine Frage des Behandlungstermins. So liessen sich nach Vorbehandlung der Tiere mit 0.25 oder 0.35 mg/kg Vindesin am Tag 9 keine Wechselwirkungen mit 0.9 Gy Röntgenstrahlen feststellen. Hingegen kam es nach Kombination der stark embryole- talen VDS-Dosis von 0.5 mg/kg und Bestrahlung zu einem signifikanten Anstieg der Abnormitäts- und Wachstumsreduktionsrate gegenüber der separaten Anwendung beider Noxen, und zwar auf einer *synergistischen* Interaktionsbasis. Im Vergleich zur Vindesin-Gruppe erhöhte sich der Anteil an wachstumsgehemmten Feten um einen Faktor von 2.1. Anders als am Tag 8 werden im Kombinationsversuch primär nicht die teratogenen Effekte verstärkt, sondern die auf eine allge- meine Proliferationshemmung zurückgehenden Wachstumsstörungen.

Anscheinend lassen sich die weniger differenzierten Embryonalzellen durch kleine Vindesin-Dosen in ihrer Strahlenempfindlichkeit stärker beeinflussen als die differenzierteren, so auch die aus Neuroblasten bestehenden präneuronalen Strukturen. Sobald die extrem strahlensensiblen Neuroblasten durch die abgegebene Strahlendosis an die Grenze ihrer Belastbarkeit gebracht werden, kann die Gegenwart eines zweiten Agens einen massiven Untergang subletal geschädigter Zellen auslösen. Nach RITTER et al. (1982) kann zudem die Kombination zweier Noxen eine vollständige Unterdrückung embryonaler Regenerationskapazität herbeiführen.

Die besondere Anfälligkeit des präsumptiven Neuralgewebes am Tag 8 auf die kombinierte Behandlung zeigt sich in der starken Zunahme der Zahl strahlenbedingter Gehirn- und Augenanomalien. Demgegenüber äussert sich die teratogene Wirkung im Kombinationsversuch am Tag 9 im vermehrten Auftreten von Extremitätendefekten (vor allem Hypodaktylie).

Zelluläre Mechanismen der synergistischen Wechselwirkungen

Um die Wirkungsursachen für synergistische Wechselbeziehungen zwischen den verwendeten Noxen verstehen zu können, sollten zuerst deren primäre Schädigungsmechanismen bekannt sein.

Die zelluläre Wirkung ionisierender Strahlen ist bekanntlich Zellzyklus-abhängig. Nach Bestrahlung während der G_2 -Phase kann es infolge eines G_2 -Blocks zur Proliferationshemmung kommen. Als besonders strahlenempfindlich in bezug auf *Zelltod* erwies sich neben der G_2 -Phase vor allem die Mitose (FRITZ-NIGGLI, 1975).

Von Vindesin ist bekannt, dass es in höheren Konzentrationen die Zellen in der S-Phase letal schädigt, während bei niedriger Dosierung mittels eines (vermutlich reversiblen) Metaphasen-Blocks lediglich die Mitoseaktivität herabgesetzt wird (HILL und WHELAN, 1980; BELLAMY und HILL, 1984; GAUKROGER et al., 1985).

Im Folgenden werden einige Interpretationen der synergistischen Wirkungsweisen zwischen Vindesin und Röntgenstrahlen vorgestellt:

- Als allgemeine Erklärung bietet sich die Hemmung des Repair vom Strahlenschaden durch das Chemikalien an. Diese Art der Effektsteigerung wurde für Substanzen wie Actinomycin D, Adriamycin, Dactinomycin, 5-Bromodeoxyuridin, Ledermycin und Cis-Platin bereits nachgewiesen (FRITZ-NIGGLI und MICHEL, 1971; VALERIOTE und LIN, 1975; FU, 1985). Naturgemäss können Röntgenstrahlen auch die Erholung von der chemisch-induzierten Schädigung beeinträchtigen (BELLAMY und HILL, 1984).

- Die Steigerung der Strahlenwirksamkeit durch nicht-embryotoxische Vindesin-Konzentrationen könnte mit dem Phänomen einer partiellen *Zellsynchronisation* zusammenhängen. Werden niedrige Dosenungen des Antimetabolikums vor der Strahlenexposition verabreicht, so kann es zur Anhäufung von Zellen in der Metaphase kommen (Spindelgift-Wirkung). Nach Aufhebung des Mitose-Blocks treten dann die Zellen mehr oder weniger gleichzeitig (synchron) in die strahlenempfindliche G_2 -Phase und tragen damit zur Verstärkung der Strahleneffektivität bei.

Es stellt sich die Frage, ob der relativ kurze Zeitabstand zwischen Applikation des Chemikarums und der Bestrahlung (1 h) zu einer genügenden Anreicherung der Metaphasen ausreicht. Man müsste zudem davon ausgehen, dass Vindesin ausserst schnell in das embryonale Zielgewebe hineingelangen. Da am Tag 2 der Gestation noch keine wirksame Plazenta vorhanden ist, scheint dies ohne weiteres möglich zu sein. SCHULTZE (1979) bezweifelt allerdings, ob die Vinca Alkaloide eine Zell-Synchronisation bewirken können. Die nach Angabe von Vindesin in der Metaphase arretierten Zellen kehrten nicht mehr in die Proliferation zurück (eine Bedingung für die Synchronisation), sondern wurden allesamt nekrotisch.

- Für die Potenzierung der Strahlenwirkung durch das Zytostatikum könnte auch die für das Vindesin nachgewiesene Beeinflussung der Bildung des zyklischen AMP infolge der Einwirkung auf den Adenylat-Zyklast-Komplex in Frage kommen (HOWARD et al., 1980; BRADY, 1981). Durch die Vindesin-bedingte Veränderung des Energiemetabolismus kann die *Reparaturkapazität* embryonaler Zellen beeinträchtigt werden, nach FRITZ-NIGGLI (1975) ein Charakteristikum strahlensensibilisierender Agenzien.

- Ein interessantes Phänomen wurde bei den verwandten Vinca Alkaloiden Vinblastin und Vincristin beobachtet: die beiden Pharmaka bewirken bei Tumorzellen einen G_2 -Block als Folge der Zerstörung mikrotubulärer Strukturen (MUJAGIC, 1983; SAMPERIZ et al., 1985). Kürzlich weist sich auch für das Vindesin eine starke Verlängerung der G_2 -Phase nachweisen (MAURO et al., 1986). Somit könnte die Potenzierung der Strahlenwirkung im Kombinationsversuch auch mit der chemisch-induzierten Verlängerung der strahlenempfindlichen G_2 -Phase erklärbar sein. Dies würde allerdings bedeuten, dass die beiden Noxen auf die gleiche Phase des Zellzyklus einwirken, nach NIAS (1976) ein besonders effizienter Kombinationsmodus von ionisierenden Strahlen und Zytostatika.

- Es ist anzunehmen, dass nicht nur Vindesin den Strahlenschaden, sondern auch umgekehrt die Bestrahlung die Toxizität des Alkaloids zu erhöhen vermag. Für diese Möglichkeit

spricht die Tatsache, dass ionisierende Strahlen auf grund ihrer Direktwirkung schneller an den Embryo gelangen als das Chemikaliuim. Falls eine niedrige Strahlendosis einen vorübergehenden G_2 -Block induzieren würde, könnten die aus dem Block entlassenen Zellen synchron in die Mitose eintreten. Der Metaphasen-Effekt des Vindesins wäre unter diesen Bedingungen beträchtlich höher als in alleiniger Verabreichung. Geht man davon aus, dass die Substanz eine gewisse Zeitspanne braucht, bis sie in den Embryonalzellen angereichert und damit wirksam wird, so ist eine "Vindesin-sensibilisierende" Wirkung von Röntgenstrahlen durchaus möglich.

- Eine letzte Erklärung für die Toxizitätssteigerung des Vindesins im Kombinationsversuch wäre eine beschleunigte Anreicherung der Substanz im Zielgewebe mittels einer strahlenbedingten Erhöhung der Zellmembran-Permeabilität gegenüber dem Chemikaliuim. Dadurch könnte Vindesin seine Wirksamkeit früher, unter Umständen bereits während der kritischen Phasen der Pränatalentwicklung, entfalten.

Zusammengefasst erbrachte die makroskopische Analyse Beweise für das erhöhte Schädigungsrisiko des vorgeburtlichen Organismus nach einer gemeinsamen Exposition mit niedrigen Dosen von Vindesin und Röntgenstrahlen während der frühen Organogenese.

2. Histologische Befunde

Zytotoxizität von Vindesin in Abhängigkeit vom Untersuchungsintervall

Mitosehemmung

Die histologische Analyse der Augenanlagen zeigte, dass Vindesin bereits in einer geringen Dosierung von 0.35 mg/kg die Zellteilungsaktivität innerhalb der Untersuchungsperiode von 24 Stunden signifikant zu unterdrücken vermag. Dabei verringert sich das Ausmass der Mitosereduktion mit fortschreitender Zeit nach Abgabe der Substanz immer mehr. Die stathmokinetiche Wirkung des Alkaloids verstärkt sich also mit dessen zunehmender Anreicherung im primordialis Gewebe nicht. Die kurz (4 Stunden) nach Behandlung auftretende Maximalwirkung ist ein Zeichen dafür, dass Vindesin äusserst schnell in das Zielgewebe hineindiffundiert. Somit scheint die Plazenta am Tag 9 der Mausentwicklung den Durchtritt der Substanz keineswegs zu behindern.

Ebenfalls die verwandten Vinca Alkaloide (Vinblastin und Vincristin) lösten bereits wenige

Stunden nach Applikation während der Frühorganogenese der Maus und Ratte einen Proliferationsstop aus (UNGTHAVORN und JONEJA, 1969; JONEJA und LELIEVER, 1973; TAKEUCHI und TAKEUCHI, 1981). UNGTHAVORN und JONEJA (1969) beobachteten einen Mitoseblock erstmals 30 Minuten nach Abgabe von 0.25 mg/kg VCR am Tag 8 der Mausgestation, wobei ein maximaler Effekt 2 Stunden nach Behandlung auftrat. Bemerkenswert ist, dass auch während der späteren Entwicklungsphasen (Spätorganogenese-Fetogenese) die Vinca Alkaloide die Plazentalschranke sehr schnell zu passieren scheinen, wie sich aus der bereits 4-6 Stunden nach Abgabe erfolgenden Mitosehemmung schliessen lässt (NOACK, 1972; TAKEUCHI et al., 1977 b).

Andererseits kann sich das embryonale Gewebe relativ rasch von dem kurz nach Behandlung induzierten Proliferationsrückstand erholen, meist innerhalb von 12-24 Stunden (UNGTHAVORN und JONEJA, 1969; JONEJA und LELIEVER, 1973; TAKEUCHI und TAKEUCHI, 1981). TAKEUCHI und Mitarbeiter (1977 b) stellten sogar bereits 9 Stunden nach Verabreichung der recht hohen VBL-Konzentration von 1.0 mg/kg am Tag 14 der Rattenentwicklung eine Normalisierung der Mitoseaktivität fest, obgleich noch 3 Stunden zuvor die Zellteilung maximal blockiert wurde.

Weiterhin ergab die Studie, dass sich die einzelnen Augenstrukturen in ihrer Empfindlichkeit auf Vindesin deutlich voneinander unterscheiden. So wird 4 Stunden nach VDS-Behandlung die spontane Vermehrungsrate der Neuroblasten im Bereiche der präsumptiven Netzhaut (distale Augenblase) um 34 %, diejenige im ventralen Augenabschnitt (Region des zukünftigen Nervus opticus) hingegen lediglich um 16 % vermindert.

Die besonders starke Reduktion der Mitosezahl in der prospektiven Netzhaut geht auf die Vindesin-bedingte Unterdrückung des Auftretens *aller* Teilungsstadien zurück, während in den übrigen Augenregionen das Zytostatikum einzig die Inzidenzen von Prophasen und Ana-/Telophasen herabsetzte. Somit werden die Retinalneuroblasten am Eintreten in die Mitosephase gehindert, und zwar mittels einer Arretierung im Stadium der S- oder G₂-Phase (HIMES et al., 1976; SWEENEY et al., 1978; PRITCHETT et al., 1985). Bereits 8 Stunden später verringert sich die antimitotische Wirksamkeit des Alkaloids auf weniger als die Hälfte, ein Teil der zuvor blockierten Zellpopulation konnte somit die Proliferation fortsetzen.

Interessanterweise unterscheiden sich die einzelnen Augenstrukturen nicht nur im Ausmass der Mitosereduktion während eines Untersuchungsintervalls, sondern auch im *zeitlichen* Auftreten des Effektes. So reagierten die Neuroblasten der präsumptiven Linse und des Augenpigments

erst 12 Stunden nach Behandlung empfindlich auf die verabreichte VDS-Dosis. Vermutlich befinden sich diese Strukturen zum erwähnten Zeitpunkt in einer *kritischen* Differenzierungsphase (UNGTHAVORN und JONEJA, 1969). Es ist nämlich wenig wahrscheinlich, dass sich die Substanz in bestimmten Gewebsabschnitten rascher anreichert als in anderen. Während jedoch 24 Stunden nach Behandlung der Mitoseblock im Augenstiel und in der Retina immer noch anhielt, lag die Proliferationsrate des Linsen- und Pigmentepithels bereits im Kontrollbereich. Somit zeichnen sich die beiden letzterwähnten Auswertungszonen nicht nur durch das relativ späte Auftreten des Mitoseblocks aus, sondern auch durch eine besonders rasche Normalisierung der Zellteilungsaktivität.

Die *Verteilung der einzelnen Mitosestadien* zu verschiedenen Zeitabständen nach VDS-Applikation liefert Informationen über die zellkinetischen Ursachen der antiproliferativen Wirksamkeit des Zytostatikums. Die Abnahme der Prophasenzahl während der gesamten Untersuchung deutet auf eine Blockierung des Zellzyklus *vor* der Mitose, vermutlich in der S-Phase (CARPENTIERI und WILLIAMS, 1968) oder in der G_2 -Phase (MAURO et al., 1986), hin. Die ebenfalls 24 Stunden lang anhaltende Reduktion der Häufigkeit von Spätmittosen (Ana- und Telophasen) ist als Folge der Hemmung des Uebergangs Metaphase-Anaphase (Spindelgift-Effekt) zu werten (FRITZ-NIGGLI, 1956; EDWARDS, 1974; RODIER et al., 1984).

MUJAGIC et al. (1983) betrachten die Metaphasen-Wirkung der Vinka Alkaloide als einen Späteeffekt, während der 1-2 Stunden nach Applikation auftretende G_2 -Block vom zellkinetischen Standpunkt her als ein Früheffekt bezeichnet wird. Die Dauer des G_2 -Blocks wird von den Autoren mit 4-8 Stunden angegeben. Die vorliegenden Ergebnisse scheinen diese Aussagen zu bestätigen. So sind die Prophasen-Anteile bereits 4 Stunden nach Behandlung im signifikanten Masse reduziert, während eine signifikante Anhäufung der Metaphasen erst 8 Stunden später zu verzeichnen ist. Ebenfalls die steigenden Frequenzen der sich in Mitose befindenden Zellen 12 und 24 Stunden nach Behandlung reflektieren die zeitliche Beschränkung des G_2 -Blocks.

Zusammenfassend scheint Vindesin seine antiproliferative Wirkung auf das primordiale Augengewebe mittels einer Blockierung der Zellen in der S- oder G_2 -Phase einerseits, sowie mittels einer Arretierung sich teilender Zellen in der Metaphase andererseits auszuüben.

Zelltod

Der zeitliche Ablauf des Vindesin-induzierten Zelltodes unterscheidet sich beträchtlich von

jenem der Proliferationshemmung. Während die Vermehrungspotenz der Neuroblasten bereits 4 Stunden nach Behandlung eingeschränkt wird, lässt sich eine zell-letale Eigenschaft des Zytostatikums erst nach einer Latenzzeit von 12 Stunden feststellen.

Die, im Vergleich zur Mitosehemmung zeitlich verzögerte Induktion von Zelltod scheint allen Vinca Alkaloiden gemeinsam zu sein. So tritt auch nach Applikation von Vinblastin oder Vincristin die Nekrose immer bedeutend später auf als die Zellteilungsreduktion, und zwar sowohl im embryonalen Gewebe (NOACK, 1972; TAKEUCHI und TAKEUCHI, 1981) wie auch in experimentellen Tumorsystemen der Maus (SCHULTZE, 1979; FEAUX DE LACROIX und MALLMANN, 1984).

Es ist bekannt, dass zur Auslösung von Zelltod eine höhere Konzentration des Vindesins benötigt wird als zur Induktion eines Mitoseblocks (GOLDHIRSCH et al., 1980). Nach HILL und WHELAN (1981) ist die Zytotoxizität des Pharmakums umso höher, je länger sich dieses im Zielgewebe aufhält. Unsere Daten bestätigen diese Aussagen. Das "erst" 12 Stunden nach Behandlung erfolgende massive Zellsterben deutet darauf hin, dass die Letalitätswirkung des Vindesins mit einer bestimmten Aufenthaltsdauer (und damit Konzentration) im Primordium verbunden ist. Bereits einen halben Tag später sinkt der Nekroseanteil im exponierten Gewebe, ein Zeichen für die abnehmende Effektivität des Alkaloids.

Die starke Zerstörung einzelner Augenpartien 12 Stunden nach Behandlung kann auch durch andere Ursachen als die starke Anreicherung des Zytostatikums im Gewebe bedingt sein. Bekanntlich wirkt Vindesin letal vorwiegend auf die Zellen in der S-Phase (HILL und WHELAN, 1980; BELLAMY und HILL, 1984; PRITCHETT et al., 1985). Bei den toten Zellen könnte es sich um die bereits früher in der S-Phase geschädigten Neuroblasten handeln, die erst nach dem Eintreten in die nachfolgende Mitose starben (MOORE et al., 1982). Solcher *reproduktiver* Zelltod kann bei einer Zellzyklus-Dauer von 8.5 Stunden (KAUFFMAN, 1968) erst nach einem längeren Zeitintervall nachgewiesen werden. Ebenfalls die in der Metaphase arretierten Zellen werden erst nach einer gewissen zeitlichen Verzögerung nekrotisch (SCHULTZE, 1979; FEAUX DE LACROIX und MALLMANN, 1984; TSUTSUI et al., 1986).

Die zuletzt angeführte Ursache für den embryonalen Zelltod wird von TAKEUCHI und TAKEUCHI (1981) allerdings stark angezweifelt. Die beiden Autoren verabreichten Vinblastin während der Frühorganogenese der Ratte (Tag 9.5) und konnten innerhalb der gesamten Untersuchungsperiode von 24 Stunden nur bei wenigen blockierten Metaphasen Degenerationszeichen feststellen. Hingegen kam es zum massiven Untergang von Zellen in der Interphase, als

Folge der mittels induzierter Membranschäden entstandenen Permeabilitätsstörungen.

Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkungen von Röntgenstrahlen

Mitosehemmung

Die histologische Analyse der antimitotischen Wirksamkeit von 0.9 Gy Röntgenstrahlen auf das präsumptive Augengewebe zeigte eine maximale Reduktion der Zellteilungsaktivität bereits kurz (4 Stunden) nach Exposition.

Es ist interessant, dass sich die Empfindlichkeit der einzelnen Augenstrukturen je nach der Art der applizierten Noxe ändert. So reagieren die Neuroblasten im Bereiche des Augensstiels deutlich sensibler auf die abgegebene Strahlendosis als die zukünftigen Retinalzellen, während die Verhältnisse nach Verabreichung des Chemikaliums gerade umgekehrt lagen. Demgegenüber zeichnet sich die Präsumptivnetzhaue durch eine besonders hohe Erholungsfähigkeit aus, die Zellteilungsfrequenz erreicht bereits 12 Stunden nach Behandlung die Kontrollebene. Dass sich die Proliferationsrate innerhalb des Augensstiels "erst" nach 24 Stunden normalisierte, liegt wohl an den anfänglich recht hohen Mitoseverlusten. Als unempfindlich hinsichtlich strahlenbedingter Zellteilungsstörungen erwies sich die Region der Augenlinse, während im Pigmentepithel nach einer Latenzzeit von 12 Stunden die Mitoserate geringfügig herabgesetzt worden ist.

Generell zeigten die Untersuchungen, dass die antiproliferative Wirkung von ionisierenden Strahlen zwar stärker ausgeprägt ist als jene des Zytostatikums, gleichzeitig jedoch sich das Augenprimordium schneller (innerhalb von 24 Stunden) vom Strahlenschaden erholen kann als vom Vindesin-induzierten Mitoseblock. In Uebereinstimmung mit unseren Daten registrierte SCHMAHL (1982) eine Normalisierung der Mitoseaktivität im Neuralgewebe der Maus bereits 16-24 Stunden nach Bestrahlung mit 0.95 Gy am Tag 11 der Gestation.

Aus dem *mitotischen Verteilungsmuster* geht hervor, dass die maximale Proliferationshemmung 4 Stunden nach Bestrahlung auf die starke Unterdrückung des Auftretens *aller* Mitosestadien im ventralen und distalen Augenabschnitt zurückgeht. Dieser Effekt deutet auf eine Arretierung der Neuroblasten in der prämitotischen G_2 -Phase, wie sie am pränatalen ZNS der Nagetiere auch von anderen Autoren (WEGNER, 1969; HOSHINO et al., 1974; 1977) nachgewiesen worden ist, hin. Dieser G_2 -Block gilt als die eigentliche Ursache der antimitotischen Strahlenwirkung (HARDING, 1971; FRITZ-NIGGLI, 1975; DENEKAMP, 1986). In Frage käme auch eine Blockierung der Zellen in der S-Phase als Folge der strahlenbedingten Hemmung der DNS-

Synthese (OKADA, 1970).

Weiterhin zeigte die Studie, dass sich die einzelnen Mitosestadien in ihrer Strahlenempfindlichkeit deutlich voneinander unterscheiden. So wird das Auftreten von Prophasen während der gesamten Untersuchungsperiode von 24 Stunden signifikant unterdrückt, während die Anteile an Ana- und Telophasen ein Tag nach Bestrahlung bereits im Kontrollbereich liegen. Die Häufigkeit von Metaphasen ist sogar schon 12 Stunden nach Exposition nicht mehr signifikant verschieden von der unbestrahlten Gruppe. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgende Reihenfolge des Strahlensensibilität ableiten: Prophase > Ana-/Telophase > Metaphase.

Die besondere Strahlenempfindlichkeit der Prophase, deren Ursache allerdings nicht bekannt ist, wurde auch von anderen Forschern hervorgehoben (CARLSON, 1950; WEGNER, 1969; FRITZ-NIGGLI, 1975). Für die reduzierte Zahl von Spätmitosen (Ana- und Telophasen) sind nach FRITZ-NIGGLI (1956, 1975) die strahlenbedingten Schädigungen der Mikrotubuli oder der Zentriolen einerseits, sowie die Chromosomenverklebungen andererseits, verantwortlich.

Zelltod

Gleichzeitig mit der starken Proliferationshemmung kommt es 4 Stunden nach Röntgenbestrahlung zu einer massiven Zerstörung des embryonalen Augengewebes. Im Unterschied zu der Wirkungsweise des Chemikaliums sind die beiden Effekte somit zeitlich nicht voneinander getrennt. Die höchste Sterblichkeitsfrequenz neuraler Stammzellen liess sich in Bereichen des Augestiels und der präsumptiven Retina feststellen (das 2-2.4-fache der spontanen Degenerationsrate), während innerhalb des zukünftigen Pigment- und Linseneithels die Schädigung weniger gravierende Ausmasse erreichte.

Obwohl die Strahlennekrose viel früher erscheint als der Vindesin-induzierte Zelltod, lässt sich auch hier eine gewisse Latenzzeit feststellen. So zeigte die Analyse der Augenanlagen 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach 0.9 Gy Röntgenbestrahlung am Tag 9 (BALLA und Mitarb., 1983), dass es während einer limitierten Zeitspanne von 3 bis 6 Stunden nach Behandlung zum extensiven Zelltod kommt.

Dass die frühembryonalen Augenanlagen (Tag 9) bedeutend sensibler sind hinsichtlich zytolethaler Strahlenwirkungen als die differenzierteren Stadien, zeigten die Untersuchungen von RUGH und WOLFF (1957). Die Exposition mit 1.5 Gy Röntgenstrahlen am Tag 12.5 der Mausentwicklung führte lediglich nach 24 Stunden zu einer gesteigerten Nekrose rate, und erst die Erhöhung der Dosis auf 2.5 Gy bewirkte bereits nach 4 Stunden eine starke Schädigung des

Primordialgewebes. Auch am Tag 11 der Gestation war die Reaktionsgeschwindigkeit der Neuroblasten trotz der hohen Dosis von 2 Gy keineswegs verkürzt, das massive Zellsterben setzte erst 6 Stunden nach Exposition ein (MURAKAMI, 1968; SAKURAI, 1968). Ebenfalls im pränatalen ZNS kommt es 2-5 Stunden nach Röntgenbestrahlung mit 1.3-2.0 Gy während der Organogenese zu einer starken Intensivierung der Degenerationshäufigkeit (HICKS und D'AMATO, 1963; D'AGOSTINO und BRIZZEE, 1966; WEGNER und HAAS, 1967; D'AMATO, 1982).

Tritt eine verstärkte Nekrotisierung innerhalb von 2-6 Stunden nach Bestrahlung auf, so handelt es sich dabei um sogenannten *akuten* oder *frühen* Zelltod (HICKS, 1952; WEGNER und HAAS, 1967; SCHMAHL, 1982). Die in der vorliegenden Studie registrierte Zelldegeneration gehört dem frühen Zeitpunkt des Erscheinens nach somit in diese Kategorie. Nach HICKS (1952) ist die akute Nekrose die Folge der direkten Strahlenwirkungen auf das embryonale Gewebe.

Was die *Länge* der verschiedenen Phasen während der Frühorganogenese der Maus anbelangt, gibt KAUFFMAN (1968) für den gesamten Embryo folgende Werte an: G_1 -Phase: 1.97 h, S-Phase: 4.62 h, G_2 -Phase: 0.59 h, Mitose: 1.32 h. Im Prinzip könnte es sich bei der 4 Stunden nach Bestrahlung auftretenden Degeneration zum Teil auch um *reproduktiven* Tod von Neuroblasten handeln, die in der späten S-Phase oder in der G_2 -Phase letal geschädigt worden sind und die erste Mitose nach der Bestrahlung passierten. Denkbar ist auch, dass sich die Nekrosepopulation aus Zellen rekrutiert, welche in den erwähnten Phasen bestrahlt wurden und beim Eintreten in die Mitose starben (MUELLER et al., 1983 a). Dieser Effekt könnte nebst des bereits erwähnten G_2 -Blocks auch an der Verringerung der mitotischen Zellpopulation beteiligt sein.

Neuere Untersuchungen der zytoletalen Strahlenwirksamkeit auf das Tumorgewebe (SKOG und TRIBUKAIT, 1985) zeigten, dass etwa 5 Stunden vor dem reproduktiven Tod das Absterben von Zellen in den prämitotischen Phasen erfolgt. Diesen Erkenntnissen nach müsste es bei der 4 Stunden nach Exposition auftretenden Strahlennekrose um einen *Interphasentod* handeln.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, in welchem Stadium des Zellzyklus der Interphasentod erfolgt. Die detaillierten Untersuchungen von SCHMAHL (1982) am präneuronalen Gewebe der Maus während der Organogenese (Tag 11) zeigten, dass eine Strahlenbelastung mit 0.95 Gy Röntgen zum Tod *aller* Neuroblasten in der G_1 und G_2 /Mitose führt. Als weniger empfindlich erwiesen sich die Zellen in der S-Phase, von denen etwa die Hälfte überlebte und

die nachfolgende Regeneration übernahm. Ob diese Verhältnisse auch für die vorliegende Studie zutreffen, müsste anhand entsprechender autoradiographischer Analysen verifiziert werden. Vermutlich stirbt der grösste Teil der exponierten Embryonalzellen in der G_2 -Phase. Obwohl dieses strahlenempfindliche Stadium normalerweise nur 1 Stunde dauert (ATLAS und BOND, 1965; KAUFFMAN, 1968), kann an Betracht des strahlenbedingten G_2 -Blocks (bis 12 Stunden nach Behandlung nachgewiesen) eine Vergrösserung der entsprechenden Zellpopulation angenommen werden.

Der hohen Strahlensensibilität des frühembryonalen Augenprimordiums steht seine bemerkenswerte Regenerationskapazität entgegen. Obwohl 4 Stunden nach Bestrahlung der grösste Teil der Anlage zerstört worden ist, erfolgte bereits 8 Stunden später eine vollständige Erholung der geschädigten Partien. Innerhalb dieser kurzen Zeit hat sich die Nekrose rate nicht nur normalisiert, sondern sank auf Grund überkompensatorischer Eliminationstätigkeit phagozytischer Zellen sogar unterhalb der Kontrollebene. Ein ähnliches Phänomen liess sich ebenfalls 24 Stunden nach Applikation der gleichen Dosis (0.9 Gy) am Tag 8 feststellen (BALLA et al., 1981). Während die Zellteilungsfrequenz immer noch nicht Normalwerte erreichte, war der Nekroseanteil im bestrahlten Gewebe wegen der verstärkten Säuberungsaktivität von Makrophagen kleiner als in den Kontrollaugen.

Mit fortschreitender Differenzierung der Augen verringert sich nicht nur deren Strahlenempfindlichkeit, sondern auch das Regenerationsvermögen. So wird nach Bestrahlung mit 1.5, 2.5 oder 3 Gy am Tag 12.5 der Mausentwicklung der Schaden erst nach 3 Tagen repariert (RUGH und WOLFF, 1957), während nach Exposition am Tag 11 mit 2 Gy die Erholung bereits nach 48 Stunden erfolgt (MURAKAMI, 1968). SAKURAI (1968) stellte ausserdem eine Abhängigkeit der Erholungspotenz embryonaler Augen von der genetischen Konstitution fest. Nachdem zwei verschiedene Mäusestämme den gleichen Versuchsbedingungen (2 Gy Röntgenstrahlen am Tag 11) ausgesetzt worden sind, kam es bei einem Stamm zur vollständigen Erholung schon nach 24 Stunden, beim anderen jedoch lediglich nach 2 Tagen.

Alle diese Befunde unterstreichen die besondere Regenerationskapazität des hier untersuchten Augenblasen-Stadiums. Die verabreichte Dosis von 0.9 Gy ist zwar kleiner als die oben genannten Strahlenmengen, muss jedoch an Betracht der höheren Sensibilität des Embryos am Tag 9 als gleich schädigend eingestuft werden. Das Ausbleiben von makroskopisch sichtbaren Augendefekten am Tag 18 lässt darauf schliessen, dass die 12 Stunden nach Bestrahlung registrierte Erholung bis zu Ende der Pränatalperiode anhält.

Reaktionsweise der Neuroblasten auf die kombinierte Anwendung von Vindesin und Röntgenstrahlen

Die Reaktionsweise der Neuroblasten der Augenanlage auf die Kombinationsbehandlung mit VDS und Röntgenstrahlen hängt ab vom Untersuchungszeitpunkt und -kriterium. Im Folgenden sollen die möglichen zell-kinetischen Ursachen der Wechselbeziehungen zwischen den beiden Agenzien diskutiert werden.

Mitosehemmung

Was die antimitotische Effektivität der kombinierten Anwendung von Vindesin und Bestrahlung anbelangt, wurde 4 Stunden nach Behandlung keine Wirkungssteigerung festgestellt. Offenbar ist die zellteilungshemmende Potenz des Chemikaliums zum gegebenen Zeitpunkt zu schwach, um die Strahlenwirkung zu beeinflussen. Die im Vergleich zum Vindesin allein deutlich verringerte Metaphasenhäufigkeit deutet darauf hin, dass die Spindelgift-Wirkung des Chemikaliums durch die Bestrahlung reduziert wird. Als Grund dafür käme der ausgeprägte strahlenbedingte G_2 -Block in Frage, wodurch die Zellen am Eintreten in die VDS-empfindliche Metaphase gehindert werden. Obwohl Vindesin eine Stunde vor der Bestrahlung injiziert wird, braucht das Zytostatikum nachgewiesenermaßen eine längere Zeit (12 Stunden), bis es seine Metaphasen-Wirkung ausüben kann. Demzufolge herrscht zu einem frühen Untersuchungszeitpunkt das Bild des strahleninduzierten Schadens vor.

Interessant ist die Normalisierung der Zellteilungsaktivität 12 Stunden nach der Kombinationsbehandlung. In alleiniger Verabreichung sind die beiden Agenzien nämlich zu diesem Zeitpunkt immer noch antimitotisch wirksam. Als naheliegendste Erklärung für dieses Phänomen bietet sich die bereits erfolgende partielle Aufhebung des G_2 - und Metaphasen-Blocks an. Dadurch können, zusätzlich zu den sich ungehindert teilenden nicht-arretierten Neuroblasten, nun auch die aus den beiden Blocks entlassenen Zellen mitotisch aktiv werden. Dies führt dann zur Wiederherstellung des normalen Proliferationsstatus.

Die 24 Stunden nach kombinierter Anwendung von Vindesin und Röntgenstrahlen erneut auftretende Welle reduzierter Mitoseraktivität illustriert die vorübergehende Natur des Erholungseffektes. Die antimitotische Wirksamkeit des Zytostatikums verdoppelt sich durch die nachfolgende Bestrahlung, im Augenstiel verdreifacht sich sogar. Die Kombinationswirkung deutet somit auf eine *synergistische* Wechselbeziehung zwischen den beiden Agenzien hin. Vom zellkinetischen Standpunkt her kommt die Verstärkung der Spindelgift-Wirkung des Vindesins im

Kombinationsversuch dadurch zustande, indem nach Aufhebung des strahlenbedingten G_2 -Blocks eine grössere Zellzahl synchron in die Mitose (und Metaphase) eintritt. Dadurch kann Vindesin seine Antitubulinwirkung im grösseren Masse entfalten als bei Einzelabgabe.

Zelltod

Die zytoletalen Wirkungen der Kombinationsbehandlung zeigten vollkommen andere Interaktionsmodalitäten als jene der antimitotischen Wirksamkeit. Der Hauptgrund dafür liegt in der Phasenspezifität der applizierten Noxen, welche zum differentiellen Reaktionsmuster führt.

So wird 4 Stunden nach Behandlung der Strahlenschaden durch das Vindesin insgesamt um einen Faktor von 1.8 gesteigert, im Augensiel-Bereich gar um einen Faktor von 2. Da sich das Chemikaliun zum gegebenen Zeitpunkt selber als nicht-toxisch erwies, kann definitionsgemäss von einer *strahlensensibilisierenden* Potenz des Alkaloids gesprochen werden. Es wäre denkbar, dass die ionisierenden Strahlen die Wirkung des Vindesin zu aktivieren vermögen. Dies, indem sie durch eine Hemmung der DNS-Synthese die Zellen in der VDS-empfindlichen S-Phase blockieren, wodurch das Zytostatikum seine Letalitätswirkung bereits zu einem früheren Zeitpunkt entfalten kann. Auch wäre es möglich, dass durch Vindesin nur sub-letal geschädigte Neuroblasten auf Grund der zusätzlichen Belastung mit Röntgenstrahlen nekrotisch wurden.

Umgekehrt kann das Zytostatikum den Strahlenschaden dadurch potenzieren, indem es die mikrotubuläre Strukturen prämitotischer Zellen zerstört. Dies führt unter anderem zu einer Verlängerung der strahlenempfindlichen G_2 -Phase (MAURO et al., 1986), wodurch die "Angriffsfläche" der ionisierenden Strahlen beträchtlich ausgedehnt wird. Eine Wirkungssteigerung im Kombinationsversuch findet auch dann statt, falls die durch Vindesin in der Metaphase blockierten Zellen synchron in die ebenfalls als strahlenempfindlich geltende G_1 -Phase (BEL-LAMY und HILL, 1984; KAMEYMAMA und HOSHINO, 1985) eintreten und dadurch den Anteil an Neuroblasten in diesem Stadium zusätzlich vergrössern. Zeitlich gesehen (Mitose: 1 1/2 Stunden, G_1 -Phase: 2 Stunden) wäre dies ohne weiteres möglich.

Es scheint somit, dass an der *synergistischen* Wechselbeziehung zwischen den beiden Noxen mehrere Mechanismen beteiligt sind, wie dies bereits von FU (1985) hervorgehoben worden ist.

Weitere Untersuchungen der Kombinationswirkungen zeigten, dass die strahlensensibilisierende Eigenschaft des Alkaloids auf den 4 Stunden-Intervall beschränkt bleibt. Bereits 12 Stunden nach Behandlung wird die ausgeprägte Zytotoxizität des Chemikaliuns durch die Nachbestrahlung stark unterdrückt, und zwar in allen Augenregionen. Besonders markante Suppression des

Vindesin-induzierten Zelltodes fand innerhalb der präsumptiven Retina statt, wo die Nekroserate im Kontrollbereich lag. Insgesamt war die Degenerationshäufigkeit nur noch um 20 % höher als in der unbehandelten Referenzgruppe, während Vindesin allein die spontane Zelltodfrequenz um ganze 90 % steigerte.

Einen halben Tag später (24 Stunden nach Behandlung) wird die Schädigungspotenz des Zytostatikums infolge der unverminderten Suppressionswirkung der Röntgenstrahlen dermassen stark herabgesetzt, dass die durchschnittliche Zelltodfrequenz in der Augenanlage nicht mehr signifikant verschieden von der Kontrolle ist.

Bevor auf die eigentlichen Wechselbeziehungen eingegangen wird, muss zuerst das Verhalten der verwendeten Agenzien im Einzelversuch berücksichtigt werden. Stellten 4 Stunden nach Behandlung die Röntgenstrahlen das aktive und Vindesin das inaktive Agens dar, so lagen während der beiden nachfolgenden Intervalle die Verhältnisse genau umgekehrt. Demzufolge kann von einer *Schutzwirkung* ionisierender Strahlen in bezug auf den Vindesin-induzierten Zelltod gesprochen werden. In Uebereinstimmung mit vorliegenden Ergebnissen registrierten MOORE und Mitarb. (1982) ebenfalls nach einer Bestrahlung der mit Vincristin injizierten Mäusen eine verminderte Letalitätswirkung des Alkaloids auf das Kryptenepithel. Nach Ansicht der Autoren geht ein solcher Kombinationseffekt auf das strahlenbedingte Blockieren der Zellen in der G_2 -Phase zurück. Dadurch wird die Giftwirkung der Vinca Alkaloide auf die Mitosespindel verumöglicht. Zudem fördert eine Verlängerung der G_2 -Phase die Erholung jener prämitotischen Zellen, deren mikrotubuläre Strukturen durch das Zytostatikum geschädigt worden sind.

Die Analyse der Mitoseaktivität 24 Stunden nach Kombinationsbehandlung zeigte, dass die Neuroblasten nach Aufhebung des strahleninduzierten G_2 -Blocks gehäuft in die Mitose eintreten und dadurch eine Verstärkung des Vindesin-bedingten Metaphasen-Blocks herbeiführen. Da Vindesin jedoch seine letale Wirkung während der S-Phase ausübt, bleiben die in der Mitose arretierten Zellen vor der vitalen Schädigung durch das Zytostatikum geschützt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass nach alleiniger Applikation des Vindesins bei einem verminderten Metaphasen-Effekt die Zell-Letalität beträchtlich angestiegen ist.

Die ermittelten histologischen Daten liefern auch eine Erklärung für das Ausbleiben von synergistischen Kombinationseffekten auf der makroskopischen Ebene. Auf der zellulären Ebene vermag das Zytostatikum die Strahlenreaktion zwar zu steigern, doch ist diese strahlensensibilisierende Eigenschaft auf eine kurze Zeitspanne von 4 Stunden limitiert. Die kurz nach Behandlung entstandenen massiven Zellverluste werden dadurch kompensiert, indem anschliessend die

starke Zytotoxizität des Chemikaliams infolge der antagonistischen Interaktion mit Röntgenstrahlen weitgehend abgebaut wird. Vielleicht sind solche Schutzwirkungen des einen Agens vor der Toxizität des anderen ein integraler Bestandteil embryonaler Abwehrmechanismen gegenüber schädigenden Umwelteinflüssen.

V. LITERATURVERZEICHNIS

- ARMSTRONG, J.G., DYKE, R.W. and FOUTS, P.J. (1964): Vinblastine sulfate treatment of Hodgkin's disease during a pregnancy. *Science* **143**, 703.
- ATLAS, M. and BOND, V.P. (1965): The cell generation cycle of the eleven day mouse embryo. *J. Cell Biol.* **26**, 19-24.
- BALLA, I. and MICHEL, C. (1982): Cellular damage of the early eye-anlage following X-irradiation of the mouse embryo. In: *Developmental Effects of Prenatal Irradiation, International Symposium*, Neuherberg near Munich, 26-28 Nov. 1980 (H. Kriegel, W. Schmahl, G. Kistner and F.E. Stieve, eds.), pp. 59-64. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York.
- BALLA, I., MICHEL, C. and FRITZ-NIGGLI, H. (1981): Cellular damage and recovery of the early developing mouse eye following low dose irradiation. I. X-rays on day 8 of gestation. *Experientia* **37** (10), 1105-1106.
- BALLA, I., MICHEL, C. and FRITZ-NIGGLI, H. (1983): Cellular damage and recovery of the early developing mouse eye following low dose irradiation. II. X-rays on day 9 of gestation. *Experientia* **39** (1), 95-96.
- BARENDSSEN, G.W. (1981): Experimental studies on Combined Radio-Chemotherapy. *Bull. Du Cancer* **68** (2), 121-126.
- BARENDSSEN, G.W. and JANSE, H.C. (1978): Differences in effectiveness of combined treatments with ionizing radiation and vinblastine, evaluated for experimental sarcomas and squamous cell carcinomas in rats. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **4** (1-2), 95-102.
- BECKMAN, D.A. and BRENT, R.L. (1984): Mechanisms of teratogenesis. *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.* **24**, 483-500.
- BEIR III (1980): Committee on the Biological Effects on Population of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiations. Washington D.C. 2041: National Academy Press, National Academy of Sciences. N.Y., 638 pp.
- BELLAMY, A.S. and HILL, B.T. (1984): Interactions between clinically effective antitumor drugs and radiation in experimental systems. III-I. Vinca alkaloids. *Biochim. Biophys. A.* **738**, 157-158.

- BOLANDE, R.P. (1973): Relationships between teratogenesis and oncogenesis. In: Pathobiology of Development - Or Ontogeny Revisited (E.V.D. Perrin and M.J. Finegold, eds.), pp. 114-134. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- BRADY, W.P. (1981): Critical review of pharmacology, toxicology, pharmaco-kinetics of vincristine, vindesine, vinblastine. In: Contributions to Oncology, Vol. 6 (W.Brady, G.A. Nagel and S. Seiber, eds.), pp. 95-123. S. Karger Verlag, Basel/München.
- BRENT, R.L. (1970): Effects of radiation on the foetus, new-born and child. In: Late Effects of Radiation (R.J.M. Fry, D. Grahn, M.L. Griem and J.H. Rust, eds.), pp. 23-60. Taylor & Francis LTD, London.
- BRENT, R.L. (1979): Effects of ionizing radiation on growth and development. Contr. Epidemiol. Biostatist., Vol. 1, pp. 147-183. S. Karger Verlag, Basel.
- BRENT, R.L. (1980): Radiation teratogenesis. Teratology 21, 281-298.
- BRENT, R.L. (1984): The effects of ionizing radiation, microwaves, and ultrasound on the developing embryo: clinical interpretations and applications of the data. Current Problems In Pediatrics, Vol. 14 (9), pp. 2-87. Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago.
- BURDMAN, J.A. (1966): A note on the selective toxicity of vincristine sulfate on chick embryo sensory ganglia in tissue culture. J. Nat. Canc. Inst. 37, 331-335.
- CARLSON, J.G. (1950): Effects of radiation on mitosis. J. Cell. Comp. Physiol. 35, 89-101.
- CARPENTIERI, U. and WILLIAM, J.P.G. (1968): Stathmokinetic agents and the mitotic index in embryo and adult rats. Curr. Mod. Biol. 2, 4-6.
- CEKAN, E., TRIBUKAIT, B. and VOKAL-BOREK, H. (1985): Protective effect of selenium against ionizing radiation-induced malformations in mice. Acta Radiol. Oncol. 24 (3), 267-271.
- CLAYTON, F.C. and FRANCOER, R.T. (1971): Some teratogenic effects of vinblastine on the external morphology of *Drosophila melanogaster*. Oncology 25, 188-192.
- COHEN, A.I. (1961): Electron microscopic observation of the developing mouse eye. Devel. Biol. 3, 297-316.

- COHLAN, S.Q., DANCIS, J. and KITAY, D. (1964): Vinblastin. *Lancet* **1**, 1390.
- COHLAN, S.Q. and KITAY, D. (1965): The teratogenic effect of vinca leucoblastine in the pregnant rat. *J. Ped.* **66**, 541-544.
- COULOMBRE, A.J. and COULOMBRE, J.L. (1977): Abnormal organogenesis in the eye. In: *Handbook of Teratology*, Vol. 2 (J.G. Wilson and F.C. Fraser, eds), pp. 329-341. Plenum Press, New York/London.
- COURTNEY, K.D. and VALERIO, D.A. (1968): Teratology in the *Macaca mulatta*. *Teratology* **1**, 163-172.
- CREASEY, W. (1981): Biochemical effects of vindesine. *Br. J. Canc.* **44**, 921-924.
- CULP, H.W., DANIELS, W.D. and McMAHON, R.D. (1977): Disposition and tissue levels of [^3H] vindesine in rats. *Canc. Res.* **37**, 3053-3056.
- CHRISTENSEN, N. (1976): Ocular malformations induced by radiation of the mouse embryo. A histopathological study with a particular view to stage specificity. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, Section A, Suppl. No. 254, pp. 152. Munksgaard, Copenhagen.
- CHUN, Y.H., JOHNSON, E.M. and GABEL, B.E.G. (1983): Relationship of developmental stage effects of vinblastine on the artificial "embryo" of hydra. *Teratology* **27** (1), 95-100.
- D'AGOSTINO, A.N. and BRIZZEE, K.R. (1966): Radiation necrosis and repair in rat fetal cerebral hemisphere. *Arch. Neur.* **15**, 615-628.
- D'AMATO, C.J. (1982): Regeneration and recovery in the fetal nervous system after radiation injury. *Exp. Neurol.* **76**, 457-467.
- DEMYER, W. (1964): Vinblastine-induced malformations of face and nervous system in two rat chains. *Neurology* **14**, 806-808.
- DEMYER, W. (1965): Cleft lip and jaw in fetal rat by vincristine. *Arch. Anat.* **48**, 181-186.
- DENEKAMP, J. (1986): Cell kinetics and radiation biology. *Int. J. Radiat. Biol.* **49** (2), 357-380.
- DIBELLA, N.J., BERRIS, R., GARFIELD, D., FINK, K., SPEER, J. AND SAKAMOTO,

- A.(1984): Vindesine in advanced breast cancer, lymphoma and melanoma. A Colorado clinical oncology group study. *Investigational New Drugs* **2** (3), 232-238.
- DYKE, R.W. and NELSON, R.L. (1977): Phase I anti-cancer agents. Vindesine (desacetyl vinblastine amide sulfate). *Canc. Treat. Rev.* **4**, 135-142.
- EDWARDS, M.J., MULLEY, R., RING, S. and WANNER, R.A. (1974): Mitotic cell death and delay of mitotic activity of guinea pigs following brief maternal hyperthermia. *J. Embr. Exp. Morph.* **32**, 593-602.
- FEAUX DE LACROIX, W. and MALLMANN, H. (1984): Comparative investigations on the effect of different dose schedules of the phase-specific drug vincristine (VCR) on the proliferation kinetics of a solid experimental tumour. *Cell Tiss. Kinet.* **17**, 583-591.
- FERM, V.H. (1963): Congenital malformations in hamster embryos after treatment with vinblastine and vincristine. *Science* **141**, 420.
- FERM, V.H. (1964): Effects of transplacental mitotic inhibitors on the fetal hamster eye. *Anat. Rec.* **148**, 129-133.
- FRAENZ, J. (1971): Cytological aspects of embryotoxicity and teratogenicity. In: *Malformations Congénital des Mammifères* (H. Tuchmann-Duplessis, ed.), pp. 151-158. Masson et Cie., Paris.
- FRANCOEUR, R.T. and WILBER, C.G. (1968): Amphibian regeneration and the teratogenic effects of vinblastine. *Oncology* **22**, 302-311, 1968.
- FRITZ-NIGGLI, H. (1956): Die Wirkung der 31 MeV-Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Vicia Faba L.* im Vergleich zu 180 keV. *Oncologia* **9**, 269-279.
- FRITZ-NIGGLI, H. (1959): Die Wirkung der Strahlen auf Embryo, Fötus und sich entwickelnde Lebewesen. In: *Strahlenbiologie. Grundlagen und Ergebnisse*, pp. 203-252. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- FRITZ-NIGGLI, H. (1972): Strahlenbedingte Entwicklungsstörungen. Sonderdruck aus *Handbuch der medizinischen Radiologie* (O. Olsson, F. Strnad, H. Vieten und A. Zuppinger, eds.). Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.
- FRITZ-NIGGLI, H. (1975): *Strahlengefährdung/Strahlenschutz. Ein Leitfaden für die Praxis.*

Verlag Hans Huber, Bern/Stuttgart/Wien. 255 Seiten.

- FRITZ-NIGGLI, H. und MICHEL, C. (1971): Sensibilisierung der Strahlenschädigung von Rattenembryonen durch Demethylchlortetracyclin (Ledemycin). *Atomkernenergie* **18**, 105-108.
- FRITZ-NIGGLI, H. and MICHEL, C. (1976): Interactions of lucanthone and low radiation doses on mouse embryos in relation to LET and dose-rate. In: *Modification of Radiosensitivity of Biological Systems*, pp. 167-178. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- FRITZ-NIGGLI, H., MICHEL, C. and RAO, K.R. (1974): Sensitizing effect of reverin (pyrrolidinomethyltetracycline) on the radiation damage of rat embryos as compared to its effect on the other cell systems. *Agents and Actions* **4**, 54-60.
- FU, K.K (1985): Biological basis for the interaction of chemotherapeutic agents and radiation therapy. *Cancer* **55**, 2123-2130.
- GARCIA-PORRERO, J.A. and OJEDA, J.L. (1978): Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina. A TEM and SEM study. *Experientia* **35**, 375-376.
- GAUKROGER, J.M., WILSON, L. and MACKIE, R. (1985): Cytotoxicity of etretinate and vindesine. *Brit. J. Canc.* **52** (3), 369-375.
- GERZON, K. (1980): Dimeric Catharanthus alkaloids. In: *Anticancer Agents Based on Natural Product Models* (J.M. Cassady and J.D. Dousos, eds.), pp. 271-317. Academic Press Inc., New York.
- GIETZEN, K., WUETHRICH, A., MANSARD, A. and BADER, H. (1981): Effects of vinca alkaloids on calmodulin-dependent Ca^{2+} -Transport ATPase. In: *Contributions to Oncology*, Vol. **6** (W. Brade, G.A. Nagel and S. Seeber, eds.), pp. 17-26. S. Karger Verlag, Basel/München.
- GLUECKSMANN, A. (1959): Changes produced in tissues by irradiation. *Proc. Soc. Med.* **52**, 500-504.
- GOERTTLER, KL. (1964): Der pränatale Organismus als reagierendes Subjekt. *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.*, pp. 336-359. Schwabe & Co Verlag, Basel/Stuttgart.
- GOLDHIRSCH, A., JOSS, R., SONNTAG, R.W. and BRUNNER, K.W. (1980): Vindesine, ein neues Zytostatikum aus der Reihe der Vinca Alkaloide. *Dt. med. Ws.* **105**, 931-935.

- GRDINA, D.J. and WHITE, R.A. (1983): Treatment of artificially-induced pulmonary metastases with fractionated doses of vincristine and/or radiation therapy. *Clinical Experimental Metastasis*, Vol. **I** (1), 71-82.
- GRUENWALD, P. (1947): Mechanisms of abnormal development. *Arch. Path.* **44**, 394-648.
- HALL, E.K. (1953): Developmental anomalies in the eye of the rat after various experimental procedures. *Anat. Rec.* **116**, 383-391.
- HANSEN, P.W. and BRINCKER, H. (1984): Vindesine in the treatment of metastatic breast cancer. *Eur. J. Canc. Clin. Oncol.* **20** (10), 1221-1225.
- HARDING, C.V., REDDAN, J.R., UNAKAR, N.J. and BAGCHI, M. (1971): The control of cell division in the ocular lens. *Int. Rev. Cytol.* **31**, 215-300.
- HICKS, S.P. (1952): Some effects of ionizing radiations and metabolic inhibition on the developing mammalian nervous system. *J. Ped.* **40**, 489-513.
- HICKS, S.P. and D'AMATO, C.J. (1963): Malformation and regeneration of the mammalian retina following experimental radiation. In: *Les pharmacomatoses cérébrales. Deuxième colloque international sur les malformations congénitales de l'encéphale* (L. Michaux and M. Feld, eds.), pp. 45-51. S.P.E.I., Paris.
- HICKS, S.P. and D'AMATO, C.J. (1966): Effects of ionizing radiations on mammalian development. *Adv. Teratol.* **2**, 195-250.
- HILL, B.T. and BELLAMY, A.S. (1984): An overview of experimental interactions between certain antitumor drugs and X-irradiation in vitro. In: *Advances in Radiation Biology*, Vol. **11** (J.T. Lett, ed.), pp. 211-267. Academic Press, Orlando.
- HILL, B.T. and WHELAN, R.D.H. (1980): Comparative effects of vincristine and vindesine on cell cycle kinetics in vitro. *Canc. Treat. Rev.* **7** (Suppl.), 5-15.
- HILL, B.T. and WHELAN, R.D.H. (1981): Comparative cell killing and kinetic effects of vincristine or vindesine in mammalian cell lines. *J. Nat. Canc. Inst.* **67** (2), 437-444.
- HIMES, R.H., KERSEY, R.N., HELLER-BETTINGER, I. and SAMSON, F.E. (1976): Action of the vinca alkaloids vincristine, vinblastine and desacetyl vinblastine amide on microtubules in vitro. *Canc. Res.* **36**, 3798-3802.

- HOAR, R.M. (1982): Embryology of the eye. *Envir. Hlth Persp.* **44**, 31-34.
- HOLOYE, P.Y., LIBNOCH, J.A., ANDERSON, T., COX, J.D., BYHARDT, R.W. and HOFFMANN, R.G. (1984): Combined methotrexate and high-dose vincristine chemotherapy with radiation therapy for small cell bronchogenic carcinoma. *Cancer* **55** (7), 1436-1445.
- HOSHINO, K., HAYASHI, Y. and KAMEYAMA, Y. (1977): Mitotic delay following X-irradiation of matrix cells in the telencephalon of mouse foetus. *J. Rad. Res.* **18**, 27-28.
- HOSHINO, K., HAYASHI, Y., NAKANE, K. and KAMEYAMA, Y. (1974): Effects of low-dose X-radiation on the developing brain of mouse fetus. Effects of X-radiation on the cell cycle of matrix cells in the telencephalon of 10-day mouse embryo. *Ann. Rep. Res. Inst. Envir. Med. Nag. Univ.* **21**, 67-70.
- HOWARDS, S.M.H., THEOLOGIDES, A. and SHEPPARD, J.R. (1980): Comparative effects of vindesine, vinblastine and vincristine on mitotic arrest and hormonal response of L1210 leukemia cells. *Canc. Res.* **40**, 2695-2700.
- HUGHES, A.F.W. (1976): Developmental biology and the study of malformations. *Biol. Rev.* **51**, 143-179.
- JONEJA, M.G. and LELIEVER, W.C. (1973): In vivo effects of vinblastine and podophyllin on dividing cells of DBA mouse fetuses. *Can. J. Gen. Cyt.* **15**, 491-495.
- JONEJA, M.G. and LELIEVER, W.C. (1974): Effects of vinblastine and podophyllin on DBA mouse fetuses. *Toxic. Appl. Pharmac.* **27**, 408-414.
- JONEJA, M.G. and UNGTHAVORN, S. (1969): Teratogenic effects of vincristine in three lines of mice. *Teratology* **2**, 235-240.
- JORDAN, M.A., HIMES, R.H. and WILSON, L. (1985): Comparison of the effects of vinblastine, vincristine, vindesine, and vinepidine on microtubule dynamics and cell proliferation in vitro. *Canc. Res.* **45** (6), 2741-2747.
- KAL, H.B. and BARENDSEN, G.W. (1980): Cell survival and growth delay in rat R-1 tumours after radiation and vinblastine treatment. *Brit. J. Cancer* **41** (Suppl. 4), 275-278.
- KAL, H.B., BARENDSEN, G.W. and JANSE, H.C. (1979): Tumor growth delay and cell survival after treatment with irradiation and vinblastine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*

5, 1597-1600.

- KALTER, (1968): Teratology of the Central Nervous System. The University of Chicago Press, Chicago/London.
- KAMEYAMA, Y. and HOSHINO, K. (1985): Sensitive phases of CNS-development. Symposium "Radiation Risks to the Developing Nervous System", Neuherberg, June 18-19 (in Publ.).
- KAUFFMAN, S.L. (1968): Lengthening of the generation cycle during embryonic differentiation of the mouse tube. *Exp. Cell Res.* **49**, 420-424.
- KAUFMAN, M. (1979): Cephalic neurulation and optic vesicle formation in the early mouse embryo. *Am. J. Anat.* **155** (4), 425-443.
- KOEPF-MAIER, P., ERKENSWICK, P. and MERKER, H.J. (1985): Lack of severe malformations versus occurrence of marked embryotoxic effects after treatment of pregnant mice with cis-platinum. *Toxicology* **34** (4), 321-331.
- KRIEGLER, H. und SHIBATA, K. (1964): Histologische Untersuchungen über die Beeinflussung der Embryonalentwicklung bei der Maus nach Röntgenbestrahlung. I. Mitteilung. Frühembryonale Veränderungen und Beeinflussung der Augenentwicklung. *Strahlentherapie* **124**, 573-587.
- KUSAMA, T. and YOSHIKAWA, Y. (1984): The synergistic effects of radiation and caffeine on embryonic development in mice. *J. Rad. Res. (Japan Radiat. Soc.)* **25** (3), 225-233.
- LACHER, M.Jr. (1964): Vinblastine. *Lancet* **7347**, 1390.
- LEIMERT, J.T., CORDER, M.P., TEWFIK, H.H., GUTHRIE, R., MAGUIRE, L.C. and GINGRICH, R.D. (1979): Total body irradiation and cyclophosphamid, vincristine, and prednisone in the treatment of favorable prognosis non-Hodgkin's lymphoma. *Oncol. Biol. Phys.* **5**, 1479-1483.
- MAGDON, E. (1980): Zum gegenwärtigen Stand des Einsatzes von Radiosensitizern in der Strahlentherapie aus strahlenbiologischer Sicht. *Radiobiol. Radiother.* **21** (6), 778-787.
- MAJIMA, A. (1961): Eye-abnormalities in mice embryos caused by X-radiation of mothers. On changes in the initial stage of development by irradiation on the 8th day of pregnancy.

- Jap. J. Ophthal. **5**, 104-114.
- MAJIMA, A. (1962): Eye-abnormalities in mouse embryos and fetuses caused by X-radiation of mothers. Processes of production in case of exposure with 200 R on the 8th day of pregnancy. Nag. J. Med. Sci. **24** (3), 171-186.
- MANN, I. (1957): Origin of developmental abnormalities. In: Developmental Abnormalities of the Eye, pp. 1-41. 2. Ed. British Medical Association, London.
- MAURO, F., GOEHDE, W., SCHUMANN, J., TEODORI, L. and SPANO, M. (1986): Considerations in the design of possible cell cycle effective drugs. Int. J. Radiat. Biol. **49** (2), 307-333.
- MAYERSON, P.L. and MOSCONA, A.A. (1979): Malformation of embryonic neural retina by BrdU. Differentiation **13**, 173-184.
- MELLER, K. (1981): Effects of Concanavalin A on developing ganglions in the retina of chick embryos. J. Embr. Exp. Morph. **65**, 27-39.
- MICHEL, C. (1974): Combined effects of Miracil-D and radiation on mouse embryos. Experientia **30**, 1195-1196.
- MICHEL, C. (1982): Pränatale Bestrahlung. Wirkung kleiner Strahlenmengen und Modifikation durch andere Agenzien. Habilitationsschrift, 93 Seiten. Zentralstelle der Studentenschaft, Zürich.
- MICHEL, C. (1984): Strahleninduzierte Entwicklungsstörungen. Vierteljahrsschrift der Naturforsch. Gesell. in Zürich **129**, 105-123.
- MICHEL, C., CORDT-RIEHLE, I., FRITZ-NIGGLI, H. and SCHAEPI, K. (1983): Combined application of misonidazole and pion beams on mouse embryos. Radiat. Envir. Biophys. **21**, 155-162.
- MICHEL, C. and FRITZ-NIGGLI, H. (1977): Radiation damage in mouse embryos exposed to 1 rad X-rays or negative pions. Fortschr. Röntgenstr. **127**, 276-280.
- MICHEL, C. and FRITZ-NIGGLI, H. (1978): Induction of developmental anomalies in mice by maternal stress. Experientia **34** (105), 105-106.

- MICHEL, C. and FRITZ-NIGGLI, H. (1981): Teratogenic and radiosensitizing effects of miso-
nidazole on mouse embryos. *Brit. J. Rad.* **54**, 154-155.
- MILLER, T.P., JONES, S.E., CHESTER, A.B. and DORR, R.T. (1980): Phase II trial of vinde-
sine in breast cancer, lymphoma and other tumors: future directions. *Canc. Treat. Rev.* **7**
(Suppl.), 81-86.
- MINTON, M.J., FURLONG, R.C.S., SPARROW, G.E.A. and RUBENS, R.D. (1980): Vinde-
sine neurotoxicity. *Canc. Chemother. Pharmac.* **4**, 133.
- MOORE, J.V., PEARSON, D. and DEAKIN, D.P. (1982): Gross and cellular response of in-
testinal crypts to single and fractionated doses of vincristine plus radiation. *Int. J. Radiat.*
Biol. **42**, 305-316.
- MOSSMAN, K.L. and HILL, L.T. (1982): Radiation Risks in Pregnancy. *Obstet. Gynec.* **60**
(2), 237-242.
- MUELLER, V.O., KLEIN, M. and SCHULTZE, B. (1983 a): X-ray induced mitotic delay and
death of cells in different phases of the cell cycle. *Strahlentherapie* **159**, 34-40.
- MUELLER, W.U., STREFFER, C. and FISHER-LAHDO, C. (1983 b): Effects of a combina-
tion of X-rays and caffeine on preimplantation mouse embryos in vitro. *Radiat. Envir.*
Biophys. **22**, 85-93.
- MUELLER, W.U., STREFFER, C. and WURM, R. (1985): Supraadditive formation of micro-
nuclei in preimplantation mouse embryos in vitro after combined treatment with X-rays and
caffeine. *Teratogen., Carcinogen., Mutagen.* **5** (2), 123-131.
- MUJAGIC, H., CHEN, S., GEIST, R., OCCHIPINTI, S.J., CONGER, B., SMITH, CH.A.,
SCHUETTE, W.H. and SHACKNEY, S.E. (1983): Effects of vincristine on cell survival,
cell cycle progression, and mitotic accumulation in asynchronously growing sarcoma 180
cells. *Canc. Res.* **43** (8), 3591-3597.
- MURAKAMI, U. (1963): Studies on mechanisms manifesting congenital anomalies. *Jap. J.*
Hum. Gen. **8**, 202-226.
- MURAKAMI, U. (1965): Effects of X-radiation on the central nervous system of mice
embryos. *Neuropath. Congr. Zürich*, 747-751.

- MURAKAMI, U. (1968): Effects of X-irradiation with relation to abnormal morphogenesis. *Congen. Anom.* **8** (3), 147-162.
- NARUSE, I., KAMO, S. and SHOJI, R. (1983): Experimental induction of two inner cell masses in mouse embryos by vinblastine treatment in vitro. *Teratology* **28** (2), 215-218.
- NEBERT, D.W. and BIGELOW, S.W. (1982): Genetic control of drug metabolism: relationship to birth defects. *Semin. Perinat.* **6** (2), 105-115.
- NELSON, R.L., DYKE, R.W. and ROOT, M.A. (1980): Comparative pharmaco-kinetics of vindesine, vincristine and vinblastine in patients with cancer. *Canc. Treat. Rev.* **7** (Suppl.), 17-24.
- NIAS, A.H.W. (1976): Interactions of ionising radiation and cancer chemotherapy agents. *Biochem. Pharm.* **25**, 2117-2124.
- NOACK, W. (1971): Electron microscopic studies on the effect of vincristine on rat embryos on days 12-17. *Teratology* **4**, 496.
- NOACK, W. (1972): Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Gehirn und an den Spinalganglien von Mäuseembryonen (Tag 12-17) nach Gabe von Vincristin. *Acta Neuropath.* **22**, 42-57.
- NOMURA, T. (1977): Similarity of the mechanisms of chemical carcinogen-initiated teratogenesis and carcinogenesis in mice. *Canc. Res.* **37**, 969-973.
- OHZU, E. and SHOJI, R. (1965): Preliminary notes on abnormalities induced by velban (vinblastine sulphate) in developing mouse embryos. *Proc. Jap. Acad.* **41**, 321-325.
- OKADA, S. (1970): Radiation effects on cell progress through the life cycle. In: *Radiation Biochemistry*, Vol. **1** (K.I. Altman, G.B. Gerber and S. Okada, eds.), pp. 190-238. Academic Press, New York/London.
- OSTERTAG, B. und HEINZMANN, U. (1972): Experimentelle Strahlenteratologie und ihre allgemeine Bedeutung. *Aerztl. Forsch.* **26** (3), 87-95.
- PADMANABHAN, R., SINGH, R. and SINGH, S. (1981): Malformations of the eye resulting from maternal hypervitaminosis A during gestation in the rat. *Acta Anat.* **110** (4), 291-298.

- PEI, Y.F. and RHODIN, J.A.G. (1970): The prenatal development of the mouse eye. *Anat. Rec.* **168**, 105-126.
- PEREZ, C.A. and OLSON, J. (1969): Preoperative irradiation and chemotherapy in the cure of a mouse lymphosarcoma. *Radiology* **92**, 136-142.
- PERSAUD, T.V.N. (1979): General mechanisms and principles of teratogenesis. In: *Teratogenesis*, Suppl. **4**, pp.15-27. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- PIZZARELLO, D.J. and WITCOFSKI, R.L. (1982): Effects of radiation on embryonic and fetal development. In: *Medical Radiation Biology* (D.J. Pizzarello and R.L. Witcofski, eds.), pp. 65-74. Second Edition. Lea & Febiger, Philadelphia.
- POSWILLO, D. (1976): Mechanisms and pathogenesis of malformation. *Brit. Med. Bull.* **32**, 59-64.
- PRITCHETT, C.J., SENIOR, P.V., SUNTER, J.P., WATSON, A.J., APPLETON, D.R. and WILSON, R.G. (1985): Vindesine as a stathmokinetic agent in human rectal tumours in organ culture. *Cell Tiss. Kinet.* **18** (3), 273-277.
- RITTER, E.J., SCOTT, W.J., WILSON, J.G., MATHINOS, P.R. and RANDALL, J.L. (1982): Potentative interactions between caffeine and various teratogenic agents. *Teratology* **25** (1), 95-100.
- RODIER, P.M., ASCHNER, M. and SAGER, P.R. (1984): Mitotic arrest in the developing CNS after prenatal exposure to methylmercury. *Neurobeh. Toxic. Terat.* **6** (5), 379-385.
- ROEHRBORN, G. and BASLER, A. (1981): In vitro and in vivo studies on possible mutagenic effects of the vinca alkaloid vindesine sulfate. In: *Contributions to Oncology*, Vol. **6** (W. Brade, G.A. Nagel and S. Seeber, eds.), pp. 43-52. S. Karger Verlag, Basel/München.
- ROSENTHAL, R.C. (1981): Clinical applications of vinca alkaloids. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **179** (11), 1084-1088.
- ROSENZWEIG, A.I., CREWS, Q.E. and HOPWOOD, H.G. (1964): Vinblastine sulfate in Hodgkin's disease in pregnancy. *Ann. Int. Med.* **61**, 108-112.
- ROSSO, R., MERLANO, M., SERTOLI, M.R., CAMPORA, E., SCARDATI, D., BORASI, F. and PALLESTRINI, E. (1984): Multidrug chemotherapy (vincristine, bleomycin, and

- methotrexate [VBM] with Radiotherapy in stage III-IV squamous cell carcinoma of the head and neck. *Canc. Treat. Rep.* **68** (7-8), 1019-1022.
- ROTHMAN, K.J. (1974): Synergy and antagonism in cause-effect relationships. *Am. J. Epidemiol.* **99** (6), 385-388.
- RUGH, R. (1958): Responses of the developing fetal nervous system to roentgen irradiation. *Radiology* **71**, 729-731.
- RUGH, R. (1967): The use of ionizing radiations to determine the progression of differentiation of the mammalian retina. *Anat. Rec.* **154**, 485.
- RUGH, R. (1968): *The Mouse. Its Reproduction and Development.* Burges Publishing Company.
- RUGH, R. (1971): X-ray-induced teratogenesis in the mouse and its possible significance to man. *Radiology* **99**, 433-443.
- RUGH, R. (1973): X-rays and the retina of the primate fetus. *Arch. Ophthalmol.* **89**, 221-227.
- RUGH, R., DUHAMEL, L., OSBORNE, A.W. and VARMA, A. (1964): Persistent stunting following X-irradiation of the fetus. *Am. J. Anat.* **115**, 185-198.
- RUGH, R. and SKAREDOFF, L. (1969): X-rays and the monkey fetal retina. *Invest. Ophthalmol.* **81**, 31-40.
- RUGH, R. and WOLFF, J. (1955): Resilience of the fetal eye following radiation insult. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **89**, 248-253.
- RUGH, R. and WOLFF, J. (1957): Repair of the fetal retina following X-irradiation insult. *First Congr. Int. Sci. Neurol. Belgium*, 189-194.
- RUSSELL, L.B. and RUSSELL, W.L. (1954): An analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo. *J. Cell Comp. Physiol.* **43**, 103-147.
- SACHS, L. (1970): *Statistische Methoden.* Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.
- SAKURAI, T. (1968): Effects of X-irradiation upon the developing eye and the mechanism forming malformations of the eye. *Congen. Anom.* **8** (1), 1-11.

- SAMPERIZ, M.M.F., BLUMEN, G. and MERZEL, J. (1985): Effects of vinblastine on the cell cycle and migration of ameloblasts of mouse incisors as shown by autoradiography using ^3H -Thymidine. *Cell Tiss. Kinet.* **18**, 493-503.
- SAUERBIER, I. (1982): Unterschiedliche Konzeptionsfähigkeit der weiblichen Han: NMRI Maus. Einfluss der Verpaarung am Abend und am Morgen. *Z. Versuchstierkunde* **24**, 161-164.
- SAXEN, L. (1976): Mechanisms of teratogenesis. *J. Embr. Exp. Morph.* **36**, 1-12.
- SCOTT, W.J.Jr. (1977): Cell death and reduced proliferative rate. In: *Handbook of Teratology*, Vol. **2** (J.G. Wilson and F.C. Fraser, eds.), pp. 81-98. Plenum Press, New York/London.
- SHAPIRO, W.R. and YOUNG, D.F. (1984): Neurological complications of antineoplastic therapy. *Acta Neurol. Scand.* **70** (100), 125-132.
- SHEPPARD, J.R. (1981): Effects of vinca alkaloids on cyclic AMP metabolism of mouse splenic lymphocytes. In: *Contributions to Oncology*, Vol. **6** (W. Brade, G.A. Nagel and S. Seeber, eds.), pp. 27-36. S. Karger Verlag, Basel/München.
- SHIRAI, S. (1978 a): Eye abnormalities in mouse fetuses caused by simultaneous irradiation of X-rays and ultrasound. 1. The effects of ultrasound on the teratogenicity of X-ray irradiation. *Congen. Anom.* **18**, 261-268.
- SHIRAI, S. (1978 b): Eye abnormalities in mouse fetuses caused by simultaneous irradiation of X-rays and ultrasound. 2. Developmental abnormalities of the eye. *Congen. Anom.* **18**, 269-279.
- SCHMAHL, W. (1982): Kinetics of telencephalic neural cell proliferation during the fetal regeneration period following a single X-irradiation at the late organogenesis stage. I. Sequential study of cell kinetics during the phase of acute events. *Radiat. Envir. Biophys.* **21**, 19-31.
- SCHNEIDER, B.F. and NORTON, S. (1979): Equivalent ages in rat, mouse and chick embryos. *Teratology* **19**, 273-278.
- SCHULTZE, B. (1979): Ist eine in vivo Synchronisation von Zellen mit Vincristin möglich ? In: *Kombinierte Strahlen- und Chemotherapie* (M. Wannenmacher, F. Gauwerky und C.

- Streffer, eds.), pp. 46-51. Urban & Schwarzenberg, München/Wien/Baltimore.
- SIEBER, S.M., WHANG-PENG, J., BOTKIN, C. and KNUTSEN, T. (1978): Teratogenic and cytogenetic effects of some plant-derived antitumor agents (vincristine, colchicine, maytansine, VP-16-213 and VM-26) in mice. *Teratology* **18**, 31-48.
- SIEGEL, S. (1976): Nichtparametrische statistische Methoden. Fachbuchhandlung für Psychologie, Verlagsabteilung, Frankfurt am Main.
- SILVER, J. and HUGHES, A.F. (1973): The role of cell death during morphogenesis of the mammalian eye. *J. Morph.* **140**, 159-170.
- SINGH, S. and SANYAL, A.K. (1976): Eye anomalies induced by cyclophosphamide in rat fetuses. *Acta Anat.* **94**, 490-496.
- SIRACUSA, G., WHITTINGHAM, D.G. and DE FELICI, M. (1980): The effect of microtubule- and microfilament- disrupting drugs on preimplantation mouse embryos. *J. Embr. Exp. Morph.* **60**, 71-82.
- SKOG, S. and TRIBUKAIT, B. (1985): Irradiation induced cell death as related to cell cycle. *Acta Radiol. Oncol.* **24** (1), 87-93.
- SMALHEISER, N.R. and CRAIN, S.M. (1984): Radiosensitivity and differentiation of ganglion cells within fetal mouse retinal explants in vitro. *Devel. Brain Res.* **13** (1), 159-163.
- STEEL, G.G. (1979): Terminology in the description of drug-radiation interactions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **5**, 1145-1150.
- STORME, G., MAREEL, M., DE BRUYNE, G., and VAN KAUWENBERGE, R. (1981): Anti-invasive effect of vinca alkaloids: ultrastructural aspects and reversibility. In: *Contributions to Oncology*, Vol. 6 (W. Brade, G.A. Nagel and S. Seeber, eds.), pp. 7-15. S. Karger Verlag, Basel/München.
- STRANGE, J.R. and MURPHREE, R.L. (1972): Exposure-rate response in the prenatally irradiated rat: effects of 100 R on day 11 of gestation to the developing eye. *Radiat. Res.* **51**, 674-684.
- STREFFER, C. and MUELLER, W.U. (1984): Radiation risks from combined exposures to ionizing radiation and chemicals. In: *Advances in Radiation Biology*, Vol. 11 (J.T. Lett,

- ed.), pp.174-210. Academic Press, Orlando.
- STREFFER, C., VAN BEUNINGEN, D., MOLLS, M., PON, A., SCHULZ, S. and ZAMBOGLOU, N. (1978): In vitro culture of pre-implanted mouse embryos - a model system for studying combined effects. In: Late Biological Effects of Ionizing Radiation, Vol. II, pp. 381-396. International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna.
- SVOBODA, K.K. and O'SHEA, K.S. (1984): Optic vesicle defects induced by vincristine sulfate: an in vivo and in vitro study in the mouse embryo. *Teratology* **29** (2), 223-239.
- SWEENEY, M.J., BODER, G.B., CULLINAN, G.J., CULP, H.W., DANIELS, W.D., DYKE, R.W., GERZON, K., McMAHON, R.E., NELSON, R.L., POORE, G.A. and TODD, G.C. (1978): Antitumor activity of desacetyl vinblastine amide sulfate (vindesine) in rodents and mitotic accumulation studies in culture. *Canc. Res.* **38** (9), 2886-2891.
- TAKEUCHI, H., HASHIMOTO, M. and SHIRAI, S. (1977 a): Eye abnormalities in fetal and postnatal mice caused by 200 R of X-radiation on day 7 or 11 of gestation. *Acta Soc. Ophthalm. Jap.* **81**, 1180-1189.
- TAKEUCHI, I.K. and TAKEUCHI, Y.K. (1981): Light and electron microscopic study on the embryotoxicity of vinblastine in the neurulation-stage rat embryo. *Congen. Anom.* **21**, 81-96.
- TAKEUCHI, I.K., TAKEUCHI, Y.K. and MURAKAMI, U. (1977 b): Electron microscopy on the effect of vinblastine on the telencephalic wall of the rat embryo. *Br. J. Exp. Path.* **58**, 521-532.
- TAMAKI, M., SUGAWARA, T., KAMEYAMA, Y. and MURAKAMI, U. (1967): Vincristine induced malformations in the rat embryo. *Ann. Rep. Inst. Envir. Med. Nag. Univ.* **15**, 61-72.
- TODD, G.C., GIBSON, W.R. and MORTON, D.M. (1976): Toxicology of vindesine in mice, rats and dogs. *J. Toxic. Envir. Hlth* **1**, 834-850.
- TSUTSUI, T., SUZUKI, N., MAIZUMI, M. and BARRETT, J.C. (1986): Vincristine sulfate-induced cell transformation, mitotic inhibition and aneuploidy in cultured syrian hamster cells. *Carcinogenesis* **7** (1), 131-135.

- TUCHMANN-DUPLESSIS, H. and MERCIER-PAROT, L. (1961): Production of congenital eye malformations, particularly in rat fetuses. In: *The Structure of the Eye* (G.K. Smelser, ed.), pp.507-519.
- UNGTHAVORN, S. and JONEJA, M.G. (1969): Effects of teratogenic doses of vincristine on mitotic cells in the fetuses of DBA mice. *Am. J. Anat.* **126**, 291-298.
- UNSCEAR 1977: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. General Assembly Official Records. New York, United Nations.
- UNSCEAR 1982: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Report to the General Assembly. New York, United Nations.
- VALERIOTE, F. and LIN, H. (1975): Synergistic interaction of anticancer agents: A cellular perspective. *Canc. Chemother. Rep., Part 1*, Vol. **59** (5), 895-900.
- WAN, Y., WU, T. and DAMJANOV, I. (1983): Immediate and delayed effects of vincristine administered during early postimplantation stages of murine embryogenesis. *J. Exp. Zool.* **227** (1), 49-55.
- WEGNER, G. (1969): Zum Entstehungsmechanismus strahleninduzierter Gehirmissbildungen. *Strahlentherapie* **134**, 496-505.
- WEGNER, G. und HAAS, R. (1967): Die DNS-Neubildung und Entstehung von Missbildungen nach Röntgenganzbestrahlung früher Embryonalanlagen der Ratte. *Verh. Dt. Ges. Path.* **51**, 282-287.
- WEICK, J.K., ANTUNEZ, A., KRAUS, T.A., FABIAN, C.J. and DIXON, D. (1983): The combined modality therapy of diffuse histology non-Hodgkin's lymphoma with cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, prednisone (CHOP) and total body irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **9** (8), 1205-1208.
- WILSON, J.G. (1965): Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: *Teratology, Principles and Techniques* (J.G. Wilson, ed.), pp.262-277. Chicago Press, Chicago.
- WILSON, J.G. (1973 a): Mechanisms of teratogenesis. In: *Environment and Birth Defects*, pp. 83-96. Academic Press, New York/San Francisco/London.

- WILSON, J.G. (1973 b): Principles of teratology. In: Pathobiology of Development - Or Ontogeny Revisited (E.V.D. Perrin and M.J. Finegold, eds.), pp. 11-30. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- WODINSKY, I., SWINIARSKI, J., KENSLER, C.J. and VENDITTI, J.M. (1974): Combined radiotherapy and chemotherapy for P388 lymphocytic leukemia in vivo. *Canc. Chemother. Res.* **4** (Part 2), 73-97.
- WOLSKY, A. (1983): Abnormal eye development in drosophila after treatment with vinblastine. *Exp. Cell Biol.* **51** (6), 345-351.
- WOOLLAM, D.H.M., MILLEN, J.W. and FOZZARD, J.A.F. (1959): Influence of cortisone on the teratogenic activity of X-irradiation. *Br. J. Radiol.* **32**, 47-48.
- YIELDING, L.W., RILEY, T.L. and YIELDING, K.L. (1976): Preliminary study of caffeine and chloroquine enhancement of X-ray induced birth defects. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* **68** (4), 1356-1361.
- YOUNG, R.W. (1984): Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J. Comp. Neur.* **229**, 362-373.

TABELLEN

Tabelle 1 Durchschnittliche Implantationsrate und Mortalität bei 18-tägigen Mausfeten nach Behandlung mit Vindesin (VDS, i.p. Injektion 1 h vor Bestrahlung) oder/und 0.9 Gy Röntgenstrahlen am Tag 9 der Gestation.

BEHANDLUNG	ANZAHL WÜRFE	ANZAHL IMPLANTATE	DURCHSCHNITTliche IMPLANTATIONSRATE ($\bar{x} \pm s_x$)	MORTALITÄT TOTAL	ANZAHL FRÜTOTE [‡]	ANZAHL SPÄTOTE
KONTROLLE (SALZLÖSUNG)	15	203	13.53 $\pm$ 0.64	22 (10.84 %)	16 (7.88 %)	6 (2.94 %)
<u>VDS ALLEIN</u>						
0.25 mg/kg	11	131	11.91 $\pm$ 0.74	19 (14.50 %)	19 (14.50 %)	0 (0.00 %)
0.35 mg/kg	14	193	13.79 $\pm$ 0.67	44 (22.80 %)	42 (21.76 %)	2 (1.04 %)
0.50 mg/kg	13	182	14.00 $\pm$ 0.65	139 (76.37 %) ^{**}	134 (73.63 %)	5 (2.75 %)
1.00 mg/kg	11	130	11.82 $\pm$ 0.63	130 (100.00 %) ^{**}	130 (100.00 %)	0 (0.00 %)
<u>RÖNTGENSTRAHLEN ALLEIN</u>						
0.9 Gy	12	152	12.67 $\pm$ 0.77	14 (9.21 %)	9 (5.92 %)	5 (3.29 %)
<u>VDS + RÖNTGENSTRAHLEN</u>						
0.25 mg/kg + 0.9 Gy	10	135	13.50 $\pm$ 0.81	15 (11.11 %)	13 (9.63 %)	2 (1.48 %)
0.35 mg/kg + 0.9 Gy	13	171	13.15 $\pm$ 0.76	23 (13.45 %)	16 (9.36 %)	7 (4.09 %)
0.50 mg/kg + 0.9 Gy	15	212	14.13 $\pm$ 0.82	128 (60.38 %) ^{††}	127 (59.91 %)	1 (0.47 %)
1.00 mg/kg + 0.9 Gy	7	87	12.43 $\pm$ 0.81	87 (100.00 %) ^{††}	85 (97.70 %)	2 (2.30 %)

[‡] : Anzahl Resorptionsstellen innerhalb des Uterus

^{**} : p < 0.002 verglichen mit Kontrolle

^{††} : p < 0.002 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 2 Abnormalitätsraten (Wachstumsretardationen und Missbildungen) und Gesamtschädigung bei 18-tägigen Mausfeteten nach Behandlung am Tag 9 der Gestation. Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1.

BEHANDLUNG	ANZAHL LEBENDE	DURCHSCHNITTLICHES FETALGEWICHT IN GRAMM ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) σ^1 σ^2		ANZAHL ¹ ABNORME	GESAMT- SCHÄDIGUNG ²
KONTROLLE (SALZLÖSUNG)	181	1.17 $\pm$ 0.02	1.10 $\pm$ 0.02	17 (9.39 %)	39 (19.21 %)
<u>VDS ALLEIN</u>					
0.25 mg/kg	112	1.13 $\pm$ 0.03	1.12 $\pm$ 0.02	11 (9.82 %)	30 (22.90 %)
0.35 mg/kg	149	1.05 $\pm$ 0.04	1.06 $\pm$ 0.03	39 (26.17 %)*	83 (43.01 %)*
0.50 mg/kg	43	1.04 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.08	14 (32.56 %)	152 (83.52 %)**
1.00 mg/kg	—	—	—	—	130 (100.00 %)**
<u>RÖNTGENSTRAHLEN ALLEIN</u>					
0.9 Gy	138	1.11 $\pm$ 0.03	1.09 $\pm$ 0.02	14 (10.50 %)	28 (18.42 %)
<u>VDS + RÖNTGENSTRAHLEN</u>					
0.25 mg/kg + 0.9 Gy	120	1.06 $\pm$ 0.03	1.05 $\pm$ 0.02	9 (7.50 %)	24 (17.78 %)
0.35 mg/kg + 0.9 Gy	148	1.05 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.04	33 (22.30 %)	56 (32.75 %)
0.50 mg/kg + 0.9 Gy	84	0.94 $\pm$ 0.04	0.94 $\pm$ 0.03	47 (55.59 %)++	175 (82.55 %)++
1.00 mg/kg + 0.9 Gy	—	—	—	—	87 (100.00 %)++

1 : Gesamtzahl von Wachstumsretardationen und Missbildungen bezogen auf die Anzahl lebender Feteten.

2 : Gesamtzahl toter, wachstumsretardierter und missgebildeter Feteten bezogen auf die Anzahl Implantate.

* : $p < 0.02$; ** : $p < 0.002$ verglichen mit Kontrolle

++ : $p < 0.002$ verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 3 Arten und Häufigkeit von Abnormalitäten bei 18-tägigen Mausfeten nach Behandlung am Tag 9 der Gestation. Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1.

BEHANDLUNG	ANZAHL LEBENDE	WACHSTUMS- RETARDIERTE	TOTAL MISSGEBILDETE	HIRN- SCHÄDEN	AUGEN- SCHÄDEN	WOLFS- RACHEN	EXTREMITÄTS- ANOMALIEN	ANDERE ANOMALIEN
KONTROLLE (SALZLÖSUNG)	181	9 (4.97 %)	8 (4.42 %)	—	—	6 (3.32 %)	2 d (1.10 %)	—
<u>VDS ALLEIN</u>								
0.25mg/kg	112	6 (5.36 %)	5 (4.46 %)	1 a (0.89 %)	—	2 (1.79 %)	2 d (1.79 %)	—
0.35mg/kg	149	25 (16.77 %)**	14 (9.40 %)	—	3 c (2.01 %)	1 (0.67 %)	6 d,e (4.03 %)	4 f,g (2.68 %)
0.50mg/kg	43	7 (16.28 %)	7 (16.28 %)	—	—	5 (11.63 %)	2 e (4.65 %)	—
<u>RÖNTGENSTRAHLEN ALLEIN</u>								
0.9 Gy	138	10 (7.25 %)	4 (2.90 %)	3 a (2.17 %)	—	—	1 d (0.73 %)	—
<u>VDS + RÖNTGENSTRAHLEN</u>								
0.25 mg/kg + 0.9 Gy	120	8 (6.67 %)	1 (0.83 %)	—	—	1 (0.83 %)	—	—
0.35 mg/kg + 0.9 Gy	148	18 (12.16 %)	15 (10.14 %)	2 b (1.35 %)	1 c (0.68 %)	—	11 d,e (7.43 %)	1 g (0.68 %)
0.50 mg/kg + 0.9 Gy	84	29 (34.52 %)**	18 (21.43 %)+	2 b (2.38 %)	—	3 (3.57 %)	11 d,e (13.10 %)	2 f,g (2.38 %)

a: Exenzephalie; b: Mikrozephalie; c: Mikrophthalmie; d: Polydaktylie; e: Hypodaktylie; f: Dorsale Krümmung (Kyphose); g: Hämorrhagien

** : p < 0.02 verglichen mit Kontrolle

+ : p < 0.05; ++ : p < 0.02 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 4 Geschlechtsverhältnis bei wachstumsretardierten oder missgebildeten Mausfeten nach Behandlung am Tag 9 der Gestation. Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1.

BEHANDLUNG	LEBENDE FETEN		WACHSTUMSRETARDIERTE (%)		MISSGEBILDETE (%)	
	TOTAL	♂	♀	♂	♀	♂
KONTROLLE (SALZLÖSUNG)	181	96	85	3 (3.1)	6 (7.1)	3 (3.1)
<u>VDS ALLEIN</u>						
0.25 mg/kg	112	62	50	6 (9.7)*	0 (0.0)	2 (3.2)
0.35 mg/kg	149	88	51	17 (19.3)	8 (15.7)	7 (7.9)
0.50 mg/kg	43	28	15	6 (21.4)	1 (6.7)	4 (14.3)
<u>RÖNTGENSTRAHLEN ALLEIN</u>						
0.9 Gy	138	65	73	5 (7.7)	5 (6.9)	2 (3.1)
<u>VDS + RÖNTGENSTRAHLEN</u>						
0.25 mg/kg + 0.9 Gy	120	76	44	7 (9.2)	1 (2.3)	1 (1.3)
0.35 mg/kg + 0.9 Gy	148	76	72	13 (17.1)	5 (6.9)	5 (6.6)
0.50 mg/kg + 0.9 Gy	84	42	42	18 (42.9)	11 (26.2)	4 (9.5)*
						14 (33.3)

* : $p < 0.05$

Tabelle 5 Durchschnittliche Implantationsrate und Mortalität bei 18-tägigen Mausferen nach Behandlung am Tag 8 der Gestation. Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1.

BEHANDLUNG	ANZAHL WÜRFE	ANZAHL IMPLANTATE	DURCHSCHNITTICHE IMPLANTATIONSRATE ($\bar{x} \pm s_x$)	MORTALITÄT TOTAL	ANZAHL FRÜTOTE	ANZAHL SPÄTTOTE
KONTROLLE (SALZLÖSUNG)	17	219	12.88 $\pm$ 0.48	18 (8.22 %)	17 (7.76 %)	1 (0.46 %)
<u>VDS ALLEIN</u>						
0.25 mg/kg	17	191	11.24 $\pm$ 0.56 *	10 (5.24 %)	10 (5.25 %)	0 (0.00 %)
0.35 mg/kg	13	194	14.92 $\pm$ 0.63	12 (6.19 %)	11 (5.67 %)	1 (0.52 %)
0.50 mg/kg	15	185	12.33 $\pm$ 0.59	70 (37.84 %) ***	56 (30.27 %)	14 (7.57 %)
1.00 mg/kg	14	174	12.43 $\pm$ 0.80	111 (63.79 %) ***	109 (62.64 %)	2 (1.15 %)
<u>RÖNTGENSTRAHLEN ALLEIN</u>						
0.9 Gy	15	206	13.73 $\pm$ 0.65	14 (6.80 %)	13 (6.31 %)	1 (0.49 %)
<u>VDS + RÖNTGENSTRAHLEN</u>						
0.25 mg/kg + 0.9 Gy	17	227	13.35 $\pm$ 0.28	25 (11.01 %)	22 (9.69 %)	3 (1.32 %)
0.35 mg/kg + 0.9 Gy	13	177	13.62 $\pm$ 1.12	37 (20.90 %) ++	33 (18.64 %)	4 (2.26 %)
0.50 mg/kg + 0.9 Gy	15	190	12.67 $\pm$ 0.93	66 (30.74 %) +	62 (32.63 %)	4 (2.11 %)
1.00 mg/kg + 0.9 Gy	13	124	9.54 $\pm$ 0.75 +++	111 (89.51 %) +++	109 (87.90 %)	2 (1.61 %)

* : p < 0.05; *** : p < 0.002 verglichen mit Kontrolle

+ : p < 0.05; ++ : p < 0.02; +++ : p < 0.002 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 6 Abnormitätsraten und Gesamtschädigung bei 18-tägigen Mausfeten nach Behandlung am Tag 8 der Gestation. Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1.

BEHANDLUNG	ANZAHL LEBENDE	DURCHSCHNITTLICHES FETALGEWICHT IN GRAMM ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)		ANZAHL ABNORME ¹	GESAMT-SCHÄDIGUNG ²
KONTROLLE (SALZLÖSUNG)	201	1.19 ± 0.02	1.16 ± 0.02	8 (3.98 %)	26 (11.87 %)
<u>VDS ALLEIN</u>					
0.25 mg/kg	181	1.16 ± 0.01	1.13 ± 0.02	17 (9.39%)	27 (14.14 %)
0.35 mg/kg	182	1.13 ± 0.02	1.11 ± 0.02	24 (13.18 %)*	36 (18.56 %)
0.50 mg/kg	115	1.07 ± 0.03	1.04 ± 0.04	26 (22.61 %)**	96 (51.89 %)
1.00 mg/kg	63	1.23 ± 0.02	1.13 ± 0.02	6 (4.76 %)	114 (65.52 %)
<u>RÖNTGENSTRAHLEN ALLEIN</u>					
0.9 Gy	192	1.14 ± 0.02	1.09 ± 0.03	38 (19.79 %)**	52 (25.24 %)
<u>VDS + RÖNTGENSTRAHLEN</u>					
0.25 mg/kg + 0.9 Gy	202	1.12 ± 0.02	1.07 ± 0.02	70 (34.65 %)+	95 (41.85 %)+
0.35 mg/kg + 0.9 Gy	140	1.08 ± 0.03	1.03 ± 0.02	71 (50.71 %)+	103 (58.19 %)+
0.50 mg/kg + 0.9 Gy	124	1.06 ± 0.04	1.03 ± 0.03	42 (33.87 %)	108 (56.84 %)+
1.00 mg/kg + 0.9 Gy	13	1.14 ± 0.04	1.02 ± 0.01	9 (69.23 %)+	120 (96.77 %)+

1 : Gesamtzahl von Wachstumsretardationen und Missbildungen bezogen auf die Anzahl lebender Feten.

2 : Gesamtzahl toter, wachstumsretardierter und missgebildeter Feten bezogen auf die Anzahl Implantate.

* : p < 0.05; ** : p < 0.02; *** : p < 0.002 verglichen mit Kontrolle

+ : p < 0.05; ++ : p < 0.02; +++ : p < 0.002 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 7 Arten und Häufigkeit von Abnormalitäten bei 18-tägigen Mausfeten nach Behandlung am Tag 8 der Gestation. Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1.

BEHANDLUNG	ANZAHL LEBENDE	WACHSTUMS-RETARDIERTE	TOTAL MISSGEBILDETE	HIRN-SCHÄDEN	AUGEN-SCHÄDEN	WOLFS-RACHEN	EXTREMITÄTS-ANOMALIEN	ANDERE ANOMALIEN
KONTROLLE (SALZLÖSUNG)	201	4 (1.99 %)	4 (1.99 %)	1 a (0.50 %)	—	2 (0.99 %)	1 f (0.50 %)	—
<u>VDS ALLEIN</u>								
0.25mg/kg	181	9 (4.97 %)	8 (4.42 %)	1 a (0.55 %)	—	—	7 f (3.87 %)	—
0.35mg/kg	182	11 (6.04 %)	13 (7.14 %)	—	—	1 (0.55 %)	12 f (6.59 %)	—
0.50mg/kg	115	19 (16.52 %)	7 (6.09 %)	1 a (0.87 %)	—	2 (1.77 %)	1 f (0.87 %)	3 g (2.61 %)
1.00mg/kg	63	0 (0.00 %)	3 (4.76 %)	—	—	1 (1.59 %)	1 f (1.59 %)	1 h (1.59 %)
<u>RÖNTGENSTRAHLEN ALLEIN</u>								
0.9 Gy	192	13 (6.77 %)	25 (13.02 %)*	18 a,b (9.38 %)	1 d (0.52 %)	1 (0.52 %)	4 f (2.08 %)	1 k (0.52 %)
<u>VDS + RÖNTGENSTRAHLEN</u>								
0.25 mg/kg + 0.9 Gy	202	24 (11.88 %)	46 (22.77 %)+	25 a,b,c (12.38 %)	2 d,e (0.99 %)	3 (1.48 %)	12 f (5.94 %)	4 g,l,j (1.98 %)
0.35 mg/kg + 0.9 Gy	140	27 (19.28 %)	44 (31.43 %)+	28 a,b (20.00 %)	2 e (1.43 %)	3 (2.14 %)	10 f (7.14 %)	1 k (0.71 %)
0.50 mg/kg + 0.9 Gy	124	20 (16.13 %)	22 (17.74 %)	9 a,b,c (7.26 %)	—	3 (2.42 %)	6 f (4.84 %)	4 h,i (3.23 %)
1.00 mg/kg + 0.9 Gy	13	3 (23.08 %)	6 (46.15 %)	6 a,b (46.15 %)	—	—	—	—

a: Exenzephalie; b: Hydrozephalie; c: Mikrozephalie; d: Mikrophthalmie; e: Anophthalmie; f: Polydaktylie; g: Ohrenschäden; h: Nieren-Hypoplasie; i: Hypognathie; j: Dorsale Krümmung (Kyphose); k: Schwanzverkürzung
 * : p < 0.05; ** : p < 0.02 verglichen mit Kontrolle
 + : p < 0.05; ++ : p < 0.02 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 8 Geschlechtsverhältnis bei wachstumsretardierten oder missgebildeten Mausföten nach Behandlung am Tag 8 der Gestation. Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1.

BEHANDLUNG	LEBENDE FÖTEN		WACHSTUMSRETARDIERTE (%)		MISSGEBILDETE (%)	
	TOTAL	♂	♀	♂	♀	♂
KONTROLLE (SALZLÖSUNG)	201	117	84	1 (0.8)	3 (3.6)	1 (0.8)
<u>VDS ALLEIN</u>						
0.25 mg/kg	181	81	100	8 (9.9)*	1 (1.0)	1 (1.2)
0.35 mg/kg	182	92	90	9 (9.8)*	2 (2.2)	5 (5.4)
0.50 mg/kg	115	59	56	16 (27.1)*	3 (5.4)	6 (10.2)
1.00 mg/kg	63	37	26	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (5.4)
RÖNTGENSTRAHLEN ALLEIN						
0.9 Gy	192	106	86	8 (7.5)	5 (5.8)	9 (8.5)
<u>VDS + RÖNTGENSTRAHLEN</u>						
0.25 mg/kg + 0.9 Gy	202	98	104	17 (17.4)*	7 (6.7)	16 (16.3)*
0.35 mg/kg + 0.9 Gy	140	74	66	18 (24.3)	9 (13.6)	22 (29.7)
0.50 mg/kg + 0.9 Gy	124	59	65	15 (25.4)*	5 (7.7)	9 (15.2)
1.00 mg/kg + 0.9 Gy	13	6	7	5 (50.0)	0 (0.0)	5 (83.3)*

* : $p < 0.05$

Tabelle 9 Häufigkeit von Einzel- und Mehrfachmissbildungen bei 18-tägigen Mausfeuten nach Behandlung am Tag 8 oder 9 der Gestation. Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1.

BEHANDLUNGSMODUS	BEHANDLUNGSTAG	EINZEL- MISSBILDUNG	MEHRFACH- MISSBILDUNGEN	TOTAL
KONTROLLE (SALZLÖSUNG)	TAG 8	1.99 %	—	1.99 %
	TAG 9	4.42 %	—	4.42 %
	TAG 8	4.42 %	—	4.42 %
	TAG 9	4.46 %	—	4.46 %
	TAG 8	7.14 %	—	7.14 %
	TAG 9	4.70 %	4.70 %	9.40 %
	TAG 8	6.09 %	—	6.09 %
	TAG 9	13.95 %	2.33 %	16.28 %
	TAG 8*	4.84 %	—	4.84 %
	TAG 9*	—	—	—
<u>RÖNTGENSTRAHLEN ALLEIN</u>				
VDS + RÖNTGENSTRAHLEN	TAG 8	7.29 %	5.73 %	13.02 %
	TAG 9	2.90 %	—	2.90 %
	TAG 8	11.38 %	11.38 %	22.77 %
	TAG 9	0.83 %	—	0.83 %
	TAG 8	19.29 %	12.14 %	31.43 %
	TAG 9	8.78 %	1.35 %	10.13 %
	TAG 8	8.87 %	8.87 %	17.74 %
	TAG 9	17.86 %	3.57 %	21.43 %
	TAG 8*	15.38 %	30.77 %	46.15 %
	TAG 9*	—	—	—

* : 100 % - Letalität

Tabelle 10 Interaktionsindizes S^* für die beiden Agenzien VDS und Röntgenstrahlen in bezug auf die in der makroskopischen Studie verwendeten Kriterien. Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1.

VDS + BESTRAHLUNG (mg/kg) (Gy)	BEHANDLUNGS- TAG	S MORTALITÄT	S ABNORMITÄT	S RETARDATION	S MISSBILDUNG	S GESAMTSCHÄDIGUNG
0.25	8	0.91	1.19	1.01	1.31	1.06
	9	0.47	0.38	0.53	0.11	0.43
0.35	8	1.61	1.54	1.51	1.56	1.33
	9	0.42	0.61	0.51	0.82	0.53
0.50	8	0.78	0.80	0.69	0.93	0.74
	9	0.71	1.30	1.21	1.12	0.82
1.00	8	1.27	2.82	3.41	2.60	1.25
	9	—	—	—	—	—

* : S = Kombinationseffekt der beiden Agenzien dividiert durch die Summe der Einzelwirkungen beider Agenzien.

falls $S > 1$, Synergismus

falls $S = 1$, Additivität

falls $S < 1$, Antagonismus

Tabelle 11 Anzahl Mitosen/Schnitt ($\bar{x} \pm s_x$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 4 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN-STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN-STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	16.6 $\pm$ 0.4	14.2 $\pm$ 0.4 ***	11.0 $\pm$ 0.4 ***	11.9 $\pm$ 0.3 +
- ventrale Region	9.0 $\pm$ 0.3	7.6 $\pm$ 0.3 ***	4.8 $\pm$ 0.2 ***	6.0 $\pm$ 0.2 +++
- distale Region	3.8 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1 ***	2.8 $\pm$ 0.2 ***	2.6 $\pm$ 0.1
- dorsale Region	2.7 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1
- Linsenplakode	1.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1 *	1.0 $\pm$ 0.1

*** p < 0.005; * p < 0.05 verglichen mit Kontrolle

+++ p < 0.005; + p < 0.05 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 12 Anzahl Prophasen (P), Metaphasen (M) und Ana-Telophasen (A/T) pro Schnitt ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 4 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH			KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN-STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN-STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	P		7.43 $\pm$ 0.2	6.34 $\pm$ 0.3 ***	5.12 $\pm$ 0.2 ***	5.07 $\pm$ 0.2 ***
	M		4.52 $\pm$ 0.2	4.53 $\pm$ 0.2 ***	2.98 $\pm$ 0.2 ***	3.83 $\pm$ 0.2 ***
	A/T		4.68 $\pm$ 0.2	3.31 $\pm$ 0.2 ***	2.92 $\pm$ 0.2 ***	2.97 $\pm$ 0.2 ***
- ventrale Region	P		3.86 $\pm$ 0.2	3.26 $\pm$ 0.2 *	2.11 $\pm$ 0.1 ***	2.46 $\pm$ 0.1 ***
	M		2.36 $\pm$ 0.1	2.34 $\pm$ 0.1 ***	1.26 $\pm$ 0.1 ***	1.86 $\pm$ 0.1 ***
	A/T		2.79 $\pm$ 0.2	1.97 $\pm$ 0.1 ***	1.43 $\pm$ 0.1 ***	1.71 $\pm$ 0.1 ***
- distale Region	P		1.88 $\pm$ 0.1	1.33 $\pm$ 0.1 ***	1.45 $\pm$ 0.1 ***	1.17 $\pm$ 0.1 ***
	M		1.01 $\pm$ 0.1	0.71 $\pm$ 0.1 **	0.81 $\pm$ 0.1 *	0.97 $\pm$ 0.1 *
	A/T		0.86 $\pm$ 0.1	0.49 $\pm$ 0.1 ***	0.59 $\pm$ 0.1 *	0.48 $\pm$ 0.1 *
- dorsale Region	P		1.14 $\pm$ 0.1	1.26 $\pm$ 0.1	0.94 $\pm$ 0.1 *	0.97 $\pm$ 0.1 *
	M		0.75 $\pm$ 0.1	1.09 $\pm$ 0.1 ***	0.67 $\pm$ 0.1 *	0.65 $\pm$ 0.1 +
	A/T		0.84 $\pm$ 0.1	0.76 $\pm$ 0.1	0.71 $\pm$ 0.1	0.65 $\pm$ 0.1
- Linsenplakode	P		0.56 $\pm$ 0.1	0.49 $\pm$ 0.1 ***	0.63 $\pm$ 0.1	0.47 $\pm$ 0.1
	M		0.40 $\pm$ 0.1	0.38 $\pm$ 0.1	0.23 $\pm$ 0.1	0.35 $\pm$ 0.1
	A/T		0.19 $\pm$ 0.0	0.10 $\pm$ 0.0	0.19 $\pm$ 0.0	0.13 $\pm$ 0.0

*** p < 0.005; ** p < 0.01; * p < 0.05 verglichen mit Kontrolle
 +++ p < 0.005; + p < 0.05 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 13 Anzahl Mitosen/Schnitt ($\bar{x} \pm s_x$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 12 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	25.6 $\pm$ 0.5	21.6 $\pm$ 0.6 ***	22.5 $\pm$ 0.6 ***	24.2 $\pm$ 0.5 ++
- Augenstiel	11.2 $\pm$ 0.3	9.8 $\pm$ 0.3 **	9.2 $\pm$ 0.3 ***	11.0 $\pm$ 0.3 +++
- Retina	7.7 $\pm$ 0.2	6.5 $\pm$ 0.3 ***	7.4 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.2
- Pigmentzone	4.5 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.1 ***	4.1 $\pm$ 0.2 *	4.4 $\pm$ 0.2
- Linsenplakode	2.2 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1 *	1.8 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1

*** p < 0.005; ** p < 0.01; * p < 0.05 verglichen mit Kontrolle

+++ p < 0.005; ++ p < 0.01 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 14 Anzahl Prophasen (P), Metaphasen (M) und Ana-Telophasen (A/T) pro Schnitt ($\bar{x} \pm s_x$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 12 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH			KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN-STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN-STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	P		12.24 $\pm$ 0.3	9.13 $\pm$ 0.3 ***	9.93 $\pm$ 0.4 ***	10.96 $\pm$ 0.3 +
	M		5.76 $\pm$ 0.2	5.83 $\pm$ 0.2 *	5.67 $\pm$ 0.2 *	5.44 $\pm$ 0.2 ++
	A/T		7.61 $\pm$ 0.2	6.65 $\pm$ 0.3	6.87 $\pm$ 0.2	7.77 $\pm$ 0.3 ++
- Augenstiel	P		4.93 $\pm$ 0.2	3.68 $\pm$ 0.2 ***	3.63 $\pm$ 0.2 ***	4.54 $\pm$ 0.2 +++
	M		2.36 $\pm$ 0.1	2.71 $\pm$ 0.1 *	2.30 $\pm$ 0.1 **	2.34 $\pm$ 0.1
	A/T		3.93 $\pm$ 0.2	3.33 $\pm$ 0.2	3.26 $\pm$ 0.2	4.13 $\pm$ 0.2 +++
- Retina	P		4.01 $\pm$ 0.1	2.84 $\pm$ 0.2 ***	3.42 $\pm$ 0.2 ***	3.57 $\pm$ 0.2
	M		1.90 $\pm$ 0.1	1.76 $\pm$ 0.1	1.93 $\pm$ 0.1	1.72 $\pm$ 0.1
	A/T		1.77 $\pm$ 0.1	1.88 $\pm$ 0.1	2.06 $\pm$ 0.1	1.83 $\pm$ 0.1
- Pigmentzone	P		2.07 $\pm$ 0.1	1.73 $\pm$ 0.1 ***	1.99 $\pm$ 0.1 ***	2.03 $\pm$ 0.1
	M		0.98 $\pm$ 0.1	0.84 $\pm$ 0.1	0.85 $\pm$ 0.1	0.89 $\pm$ 0.1
	A/T		1.44 $\pm$ 0.1	1.13 $\pm$ 0.1	1.23 $\pm$ 0.1	1.44 $\pm$ 0.1
- Linsenplakode	P		1.24 $\pm$ 0.1	0.87 $\pm$ 0.1	0.88 $\pm$ 0.1	0.82 $\pm$ 0.1
	M		0.52 $\pm$ 0.1	0.46 $\pm$ 0.1 *	0.58 $\pm$ 0.1	0.49 $\pm$ 0.1
	A/T		0.46 $\pm$ 0.1	0.31 $\pm$ 0.1	0.33 $\pm$ 0.1	0.37 $\pm$ 0.1

*** p < 0.005; ** p < 0.01; * p < 0.05 verglichen mit Kontrolle

+++ p < 0.005; ++ p < 0.01; + p < 0.05 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 15 Anzahl Mitosen/Schnitt ($\bar{x} \pm s_x$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 24 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	34.2 $\pm$ 0.7	31.4 $\pm$ 0.8 ***	33.5 $\pm$ 0.6	28.5 $\pm$ 0.6 +++
- Augenstiel	17.4 $\pm$ 0.5	16.2 $\pm$ 0.6 *	16.4 $\pm$ 0.4	13.5 $\pm$ 0.4 +++
- Retina	9.5 $\pm$ 0.3	8.2 $\pm$ 0.3 ***	8.9 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.2 +++
- Pigmentzone	2.8 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2
- Linsengrube	4.5 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.2 ***	4.3 $\pm$ 0.2

*** p < 0.005; * p < 0.05 verglichen mit Kontrolle

+++ p < 0.005 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 16 Anzahl Prophasen (P), Metaphasen (M) und Ana-Telophasen (A/T) pro Schnitt ($\bar{x} \pm s_x$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 24 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN-STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN-STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	P	15.80 $\pm$ 0.4	13.56 $\pm$ 0.3 ***	11.44 $\pm$ 0.3 +++
	M	6.61 $\pm$ 0.3	8.59 $\pm$ 0.3 ***	7.48 $\pm$ 0.3 +++
	A/T	11.77 $\pm$ 0.3	11.32 $\pm$ 0.3	9.60 $\pm$ 0.3 +++
- Augensiel	P	7.12 $\pm$ 0.3	5.66 $\pm$ 0.2 ***	4.70 $\pm$ 0.2 +++
	M	3.48 $\pm$ 0.2	4.25 $\pm$ 0.2 **	3.56 $\pm$ 0.2 ++
	A/T	6.76 $\pm$ 0.3	6.49 $\pm$ 0.3	5.30 $\pm$ 0.2 +++
- Retina	P	4.89 $\pm$ 0.2	4.16 $\pm$ 0.2 *	3.33 $\pm$ 0.2 +++
	M	1.87 $\pm$ 0.1	2.22 $\pm$ 0.2	1.96 $\pm$ 0.1 +
	A/T	2.76 $\pm$ 0.2	2.49 $\pm$ 0.1	2.02 $\pm$ 0.1
- Pigmentzone	P	1.58 $\pm$ 0.1	1.59 $\pm$ 0.1	1.57 $\pm$ 0.1
	M	0.39 $\pm$ 0.1	0.43 $\pm$ 0.1	0.77 $\pm$ 0.1
	A/T	0.82 $\pm$ 0.1	0.81 $\pm$ 0.1	1.05 $\pm$ 0.1
- Linsengrube	P	2.21 $\pm$ 0.1	2.06 $\pm$ 0.1 ***	1.85 $\pm$ 0.1
	M	0.86 $\pm$ 0.1	1.27 $\pm$ 0.1	1.20 $\pm$ 0.1
	A/T	1.43 $\pm$ 0.1	1.32 $\pm$ 0.1	1.23 $\pm$ 0.1

*** $p < 0.005$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ verglichen mit Kontrolle
 +++ $p < 0.005$; ++ $p < 0.01$; + $p < 0.05$ verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 17 Prozentuale Anteile der Prophasen (P), Metaphasen (M) und Ana-Telophasen (A/T) am Total gezählter Mitosen in den Augenanlagen von Mausembryonen 4 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	P	44.7 %	46.5 %	42.7 %
	M	27.2 %	27.0 %	32.2 %
	A/T	28.1 %	26.5 %	25.1 %
- ventrale Region	P	43.1 %	44.0 %	40.8 %
	M	30.9 %	26.3 %	30.8 %
	A/T	26.0 %	29.7 %	28.4 %
- distale Region	P	52.5 %	51.0 %	44.6 %
	M	28.2 % *	28.3 %	36.9 %
	A/T	19.3 %	20.7 %	18.5 %
- dorsale Region	P	40.6 %	40.3 % *	42.6 %
	M	35.0 % ***	29.0 %	28.7 %
	A/T	24.4 %	30.7 %	28.7 %
- Linsenplakode	P	50.4 % ***	59.6 %	49.6 %
	M	39.7 % *	22.0 %	36.5 %
	A/T	9.9 %	18.4 %	13.9 %

*** p < 0.005; ** p < 0.01; * p < 0.05 verglichen mit Kontrolle
+ p < 0.05 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 18 Prozentuale Anteile der Prophasen (P), Metaphasen (M) und Ana-Telophasen (A/T) am Total gezählter Mitosen in den Augenanlagen von Mausembryonen 12 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	P	*** 42.2 %	*** 44.2 %	45.3 %
	M	*** 27.0 %	** 25.2 %	22.5 % ++
	A/T	30.8 %	30.6 %	32.2 %
- Augenstiel	P	*** 37.6 %	* 39.5 %	41.3 % +
	M	*** 28.4 %	** 25.0 %	21.3 %
	A/T	34.0 %	35.5 %	37.4 %
- Retina	P	*** 43.8 %	*** 46.2 %	50.1 %
	M	27.1 %	26.1 %	24.1 %
	A/T	29.1 %	27.7 %	25.8 %
- Pigmentzone	P	* 46.7 %	* 49.0 %	46.5 %
	M	22.7 %	20.9 %	20.5 %
	A/T	30.6 %	30.1 %	33.0 %
- Linsenplakode	P	53.3 %	49.1 %	49.0 %
	M	27.9 %	32.4 %	29.2 %
	A/T	18.8 %	18.5 %	21.8 %

*** p < 0.005; ** p < 0.01; * p < 0.05 verglichen mit Kontrolle
++ p < 0.01; + p < 0.05 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 19 Prozentuale Anteile der Prophasen (P), Metaphasen (M) und Ana-Telophasen (A/T) am Total gezählter Mitosen in den Augenanlagen von Mausembryonen 24 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN-STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN-STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	P	46.2 %	*** 40.5 %	40.1 %
	M	19.3 %	*** 25.7 %	26.2 %
	A/T	34.5 %	33.8 %	33.7 %
- Augenstiel	P	41.0 %	*** 34.5 %	34.7 %
	M	20.1 %	*** 25.9 %	26.2 %
	A/T	38.9 %	39.6 %	39.1 %
- Retina	P	51.4 %	46.9 % ***	45.6 %
	M	19.7 %	25.0 %	26.8 %
	A/T	28.9 %	28.1 %	27.6 %
- Pigmentzone	P	56.5 %	47.2 % ***	46.3 %
	M	14.0 %	24.1 %	22.7 %
	A/T	29.5 %	28.7 %	31.0 %
- Linsengrube	P	49.1 %	44.3 % ***	43.2 %
	M	19.1 %	27.3 %	28.0 %
	A/T	31.8 %	28.4 %	28.8 %

*** p < 0.005 verglichen mit Kontrolle

Tabelle 20 Anzahl Nekrosen/Schnitt ($\bar{x} \pm s_x$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 4 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	37.0 ± 1.8	26.2 ± 2.3 ***	93.5 ± 2.0 ***	171.5 ± 3.6 +++
- ventrale Region	26.2 ± 1.5	20.4 ± 1.6 *	52.2 ± 1.7 ***	105.5 ± 2.5 +++
- distale Region	9.3 ± 0.7	3.0 ± 0.5 ***	22.3 ± 0.8 ***	40.3 ± 1.3 +++
- dorsale Region	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.3	10.9 ± 0.8 ***	12.4 ± 0.7 +++
- Linsenplakode	1.3 ± 0.2	1.7 ± 0.3 ***	8.1 ± 0.4 ***	13.3 ± 0.7 +

*** $p < 0.005$; * $p < 0.05$ verglichen mit Kontrolle

+++ $p < 0.005$; + $p < 0.05$ verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 22 Korrelationsanalyse der Parameter Mitoseaktivität und Zelltod in den Augenanlagen von Mausembryonen 4 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation *. Vergleich immer innerhalb der gleichen Gruppe.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN-STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN-STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	positiv ($r=0.381$)	—	positiv ($r=0.275$)	—
- ventrale Region	positiv ($r=0.224$)	—	positiv ($r=0.397$)	positiv ($r=0.255$)
- distale Region	positiv ($r=0.191$)	—	positiv ($r=0.277$)	—
- dorsale Region	—	—	positiv ($r=0.288$)	—
- Linsenplakode	—	—	—	—

* alle in der Tabelle als positiv bezeichneten Korrelationen sind mit $p < 0.05$ statistisch gesichert.
In Klammer: r = Korrelationskoeffizient

Tabelle 23 Anzahl Nekrosen/Schnitt ($\bar{x} \pm s_x$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 12 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN-STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN-STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	68.9 $\pm$ 3.2	130.9 $\pm$ 5.6 ***	56.2 $\pm$ 1.7 *	81.7 $\pm$ 3.3 +++
- Augenstiel	39.9 $\pm$ 2.5	70.5 $\pm$ 3.1 ***	26.8 $\pm$ 1.1 ***	47.6 $\pm$ 2.6 +++
- Retina	23.1 $\pm$ 1.3	43.9 $\pm$ 2.3 ***	18.4 $\pm$ 0.9	24.6 $\pm$ 1.3 +++
- Pigmentzone	1.9 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 0.7 ***	5.9 $\pm$ 0.3 ***	4.6 $\pm$ 0.4
- Linsenplakode	4.0 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.7 ***	5.1 $\pm$ 0.3 ***	4.8 $\pm$ 0.3 +++

*** p < 0.005; * p < 0.05 verglichen mit Kontrolle

+++ p < 0.005 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 24 Prozentsatz der Schnitte mit bestimmter Zelltod-Häufigkeit in den einzelnen Augenregionen der Maus 12 Stunden nach Behandlung mit 0.35 mg/kg VDS oder/und 0.9 Gy Röntgenstrahlen am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	BEHANDLUNGSMODUS	S C H A E D I G U N G S K A T E G O R I E N *			
		1	2	3	4
- Augenstiel	KONTROLLE	42.8 %	29.7 %	14.5 %	13.0 %
	VDS ALLEIN	10.8 %	32.5 %	15.0 %	41.7 %
	STRAHLUNG ALLEIN	61.7 %	37.5 %	0.8 %	0.0 %
	VDS + STRAHLUNG	30.8 %	40.0 %	10.8 %	18.4 %
- Retina	KONTROLLE	45.7 %	48.5 %	5.8 %	0.0 %
	VDS ALLEIN	15.0 %	51.6 %	16.7 %	16.7 %
	STRAHLUNG ALLEIN	45.0 %	55.0 %	0.0 %	0.0 %
	VDS + STRAHLUNG	40.0 %	54.2 %	4.1 %	1.7 %
- Pigmentzone	KONTROLLE	100.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %
	VDS ALLEIN	90.8 %	9.2 %	0.0 %	0.0 %
	STRAHLUNG ALLEIN	99.2 %	0.8 %	0.0 %	0.0 %
	VDS + STRAHLUNG	99.2 %	0.8 %	0.0 %	0.0 %
- Linsenplakode	KONTROLLE	92.8 %	7.2 %	0.0 %	0.0 %
	VDS ALLEIN	65.8 %	16.7 %	5.8 %	11.7 %
	STRAHLUNG ALLEIN	89.2 %	10.8 %	0.0 %	0.0 %
	VDS + STRAHLUNG	90.9 %	8.3 %	0.8 %	0.0 %

* 1 vereinzelte Nekrosen
 2 mässige Nekrose
 3 extensive Nekrose
 4 massive Nekrose

Augenstiel
 bis 29 Nekrosen
 30-59 Nekrosen
 60-79 Nekrosen
 > 79 Nekrosen

Retina + Pigmentzone
 bis 19 Nekrosen
 20-49 Nekrosen
 50-69 Nekrosen
 > 69 Nekrosen

Linsenplakode
 bis 9 Nekrosen
 10-14 Nekrosen
 15-19 Nekrosen
 > 19 Nekrosen

Tabelle 25 Korrelationsanalyse der Parameter Mitoseaktivität und Zelltod in den Augenanlagen von Mausembryonen 12 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation * Vergleich immer innerhalb der gleichen Gruppe.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	-	negativ (r=-0.519)	positiv (r=0.385)	-
- Augenstiel	negativ (r=-0.209)	negativ (r=-0.430)	positiv (r=0.327)	-
- Retina	positiv (r=0.172)	negativ (r=-0.267)	-	positiv (r=0.220)
- Pigmentzone	-	-	-	-
- Linsenplakode	-	-	-	-

* alle in der Tabelle als positiv oder negativ bezeichneten Korrelationen sind mit $p < 0.05$ statistisch gesichert.
In Klammer: r = Korrelationskoeffizient

Tabelle 26 Anzahl Nekrosen/Schnitt ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 24 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN-STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN-STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	53.2 $\pm$ 2.1	89.6 $\pm$ 2.6 ***	55.8 $\pm$ 2.4	57.0 $\pm$ 2.3
- Augenstiel	13.1 $\pm$ 1.6	15.7 $\pm$ 1.8	12.4 $\pm$ 1.8	13.4 $\pm$ 1.3 +++
- Retina	17.6 $\pm$ 1.3	34.8 $\pm$ 2.3 ***	15.8 $\pm$ 1.2	24.2 $\pm$ 1.7 +++
- Pigmentzone	8.1 $\pm$ 0.4	14.4 $\pm$ 0.7 ***	12.7 $\pm$ 0.7	9.6 $\pm$ 0.6 +++
- Linsengrube	14.4 $\pm$ 0.6	24.7 $\pm$ 0.9 ***	14.9 $\pm$ 0.8 ***	9.8 $\pm$ 0.6 +++

*** p < 0.005 verglichen mit Kontrolle

+++ p < 0.005 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 27 Prozentsatz der Schnitte mit bestimmter Zelltod-Häufigkeit in den einzelnen Augenregionen der Maus 24 Stunden nach Behandlung mit 0.35 mg/kg VDS oder/lund 0.9 Gy Röntgenstrahlen am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	BEHANDLUNGSMODUS	S C H A D I G U N G S K A T E G O R I E N *			
		1	2	3	4
- Augenstiel	KONTROLLE	82.5 %	11.7 %	4.2 %	1.6 %
	VDS ALLEIN	76.6 %	14.2 %	6.7 %	2.5 %
	STRAHLUNG ALLEIN	88.4 %	3.3 %	3.3 %	5.0 %
	VDS + STRAHLUNG	84.2 %	12.5 %	3.3 %	0.0 %
- Retina	KONTROLLE	82.5 %	16.7 %	0.8 %	0.0 %
	VDS ALLEIN	42.5 %	30.0 %	21.7 %	5.8 %
	STRAHLUNG ALLEIN	84.2 %	12.5 %	3.3 %	0.0 %
	VDS + STRAHLUNG	70.8 %	17.5 %	10.9 %	0.8 %
- Pigmentzone	KONTROLLE	96.7 %	3.3 %	0.0 %	0.0 %
	VDS ALLEIN	77.5 %	20.7 %	2.5 %	0.0 %
	STRAHLUNG ALLEIN	77.5 %	22.5 %	0.0 %	0.0 %
	VDS + STRAHLUNG	91.7 %	7.5 %	0.8 %	0.0 %
- Linsengrube	KONTROLLE	76.7 %	23.3 %	0.0 %	0.0 %
	VDS ALLEIN	34.2 %	48.3 %	16.7 %	0.8 %
	STRAHLUNG ALLEIN	72.5 %	24.2 %	3.3 %	0.0 %
	VDS + STRAHLUNG	92.5 %	7.5 %	0.0 %	0.0 %

* 1 vereinzelte Nekrosen
 2 mässige Nekrose
 3 extensive Nekrose
 4 massive Nekrose

Augenstiel	Retina	Pigmentzone + Linsengrube
bis 29 Nekrosen	bis 29 Nekrosen	bis 19 Nekrosen
30-49 Nekrosen	30-49 Nekrosen	20-34 Nekrosen
50-69 Nekrosen	50-79 Nekrosen	35-49 Nekrosen
> 69 Nekrosen	> 79 Nekrosen	> 49 Nekrosen

Tabelle 28 Korrelationsanalyse der Parameter Mitoseaktivität und Zelltod in den Augenanlagen von Mausembryonen 24 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation * Vergleich immer innerhalb der gleichen Gruppe.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	negativ ($r=-0.275$)	-	-	-
- Augenstiel	negativ ($r=-0.231$)	negativ ($r=-0.266$)	-	negativ ($r=-0.290$)
- Retina	-	-	-	-
- Pigmentzone	negativ ($r=-0.239$)	-	negativ ($r=-0.197$)	-
- Linsengrube	-	positiv ($r=0.210$)	-	-

* alle in der Tabelle als positiv oder negativ bezeichneten Korrelationen sind mit $p < 0.05$ statistisch gesichert.

In Klammer: r = Korrelationskoeffizient

Tabelle 29 Anzahl Phagozyten/Schnitt ($\bar{x} \pm s_x$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 4 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN-STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN-STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	3.2 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2 ***	3.9 $\pm$ 0.2 ***	8.4 $\pm$ 0.3 +++
- ventrale Region	2.6 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1 ***	2.5 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.2 +++
- distale Region	0.6 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0 ***	0.9 $\pm$ 0.1 ***	1.6 $\pm$ 0.1 +++
- dorsale Region	---	---	0.3 $\pm$ 0.1 ***	0.6 $\pm$ 0.1
- Linsenplakode	---	---	0.3 $\pm$ 0.1 ***	0.3 $\pm$ 0.1

*** p < 0.005 verglichen mit Kontrolle

+++ p < 0.005 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 30 Korrelationsanalyse der Parameter Zelltod und Phagozytose in den Augenanlagen von Mausembryonen 4 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation * Vergleich immer innerhalb der gleichen Gruppe.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0,35 mg/kg VDS	0,9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	positiv (r=0.812)	positiv (r=0.727)	positiv (r=0.502)	positiv (r=0.623)
- ventrale Region	positiv (r=0.822)	positiv (r=0.667)	positiv (r=0.493)	positiv (r=0.621)
- distale Region	positiv (r=0.679)	positiv (r=0.676)	positiv (r=0.399)	positiv (r=0.568)
- dorsale Region	positiv (r=0.499)	positiv (r=0.546)	positiv (r=0.607)	positiv (r=0.437)
- Linsenplakode	positiv (r=0.207)	positiv (r=0.507)	-	positiv (r=0.393)

* alle in der Tabelle als positiv bezeichneten Korrelationen sind mit $p < 0.05$ statistisch gesichert.
In Klammer: r = Korrelationskoeffizient

Tabelle 31 Anzahl Phagozyten/Schnitt ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 12 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	6.6 $\pm$ 0.4	11.1 $\pm$ 0.4 ***	5.6 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.3 +++
- Augenstiel	4.2 $\pm$ 0.3	6.7 $\pm$ 0.3 ***	3.1 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 0.3 +++
- Retina	2.1 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.2 ***	1.7 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.2
- Pigmentzone	0.2 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1 *	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
- Linsenplakode	0.2 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.1 ***	0.3 $\pm$ 0.1 ***	0.2 $\pm$ 0.0

*** p < 0.005; * p < 0.05 verglichen mit Kontrolle

+++ p < 0.005 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 32 Korrelationsanalyse der Parameter Zelltod und Phagozytose in den Augenanlagen von Mausembryonen 12 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation *. Vergleich immer innerhalb der gleichen Gruppe.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	positiv (r=0.856)	positiv (r=0.491)	positiv (r=0.626)	positiv (r=0.737)
- Augenstiel	positiv (r=0.867)	positiv (r=0.468)	positiv (r=0.637)	positiv (r=0.772)
- Retina	positiv (r=0.760)	positiv (r=0.602)	positiv (r=0.576)	positiv (r=0.757)
- Pigmentzone	positiv (r=0.624)	positiv (r=0.575)	positiv (r=0.429)	positiv (r=0.520)
- Linsenplakode	positiv (r=0.398)	positiv (r=0.562)	positiv (r=0.505)	positiv (r=0.318)

* alle in der Tabelle als positiv bezeichneten Korrelationen sind mit $p < 0.05$ statistisch gesichert.
In Klammer: r = Korrelationskoeffizient

Tabelle 33 Anzahl Phagozyten/Schnitt ($\bar{x} \pm s_x$) in den Augenanlagen von Mausembryonen 24 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation.

AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN-STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN-STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	8.9 ± 0.7	13.9 ± 0.7 ***	7.5 ± 0.4	5.7 ± 0.3 ++
- Augenstiel	2.0 ± 0.3	2.3 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.2
- Retina	2.0 ± 0.2	4.6 ± 0.5 ***	1.6 ± 0.2	2.1 ± 0.2
- Pigmentzone	2.0 ± 0.6	2.7 ± 0.4 ***	1.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1 +++
- Linsengrube	2.9 ± 0.4	4.3 ± 0.4 ***	2.5 ± 0.2	1.3 ± 0.1 +++

*** p < 0.005 verglichen mit Kontrolle

+++ p < 0.005; ++ p < 0.01 verglichen mit bestrahlter Gruppe

Tabelle 34 Korrelationsanalyse der Parameter Zelltod und Phagozytose in den Augenanlagen von Mausembryonen 24 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation*. Vergleich immer innerhalb der gleichen Gruppe.

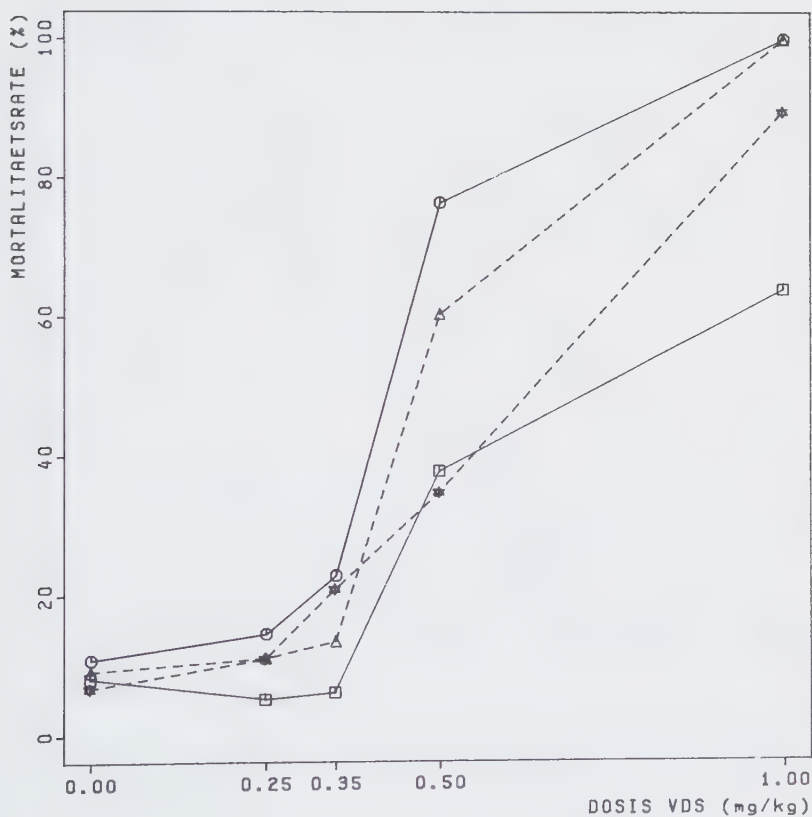
AUSWERTUNGSBEREICH	KONTROLLE	0.35 mg/kg VDS	0.9 Gy RÖNTGEN- STRAHLEN	VDS + RÖNTGEN- STRAHLEN
Gesamte Augenanlage	positiv ($r=0.438$)	positiv ($r=0.502$)	positiv ($r=0.845$)	positiv ($r=0.815$)
- Augenstiel	positiv ($r=0.928$)	positiv ($r=0.941$)	positiv ($r=0.933$)	positiv ($r=0.854$)
- Retina	positiv ($r=0.852$)	positiv ($r=0.574$)	positiv ($r=0.824$)	positiv ($r=0.830$)
- Pigmentzone	positiv ($r=0.483$)	positiv ($r=0.300$)	positiv ($r=0.661$)	positiv ($r=0.667$)
- Linsengrube	positiv ($r=0.364$)	positiv ($r=0.358$)	positiv ($r=0.804$)	positiv ($r=0.731$)

* alle in der Tabelle als positiv bezeichneten Korrelationen sind mit $p < 0.05$ statistisch gesichert.

In Klammer: r = Korrelationskoeffizient

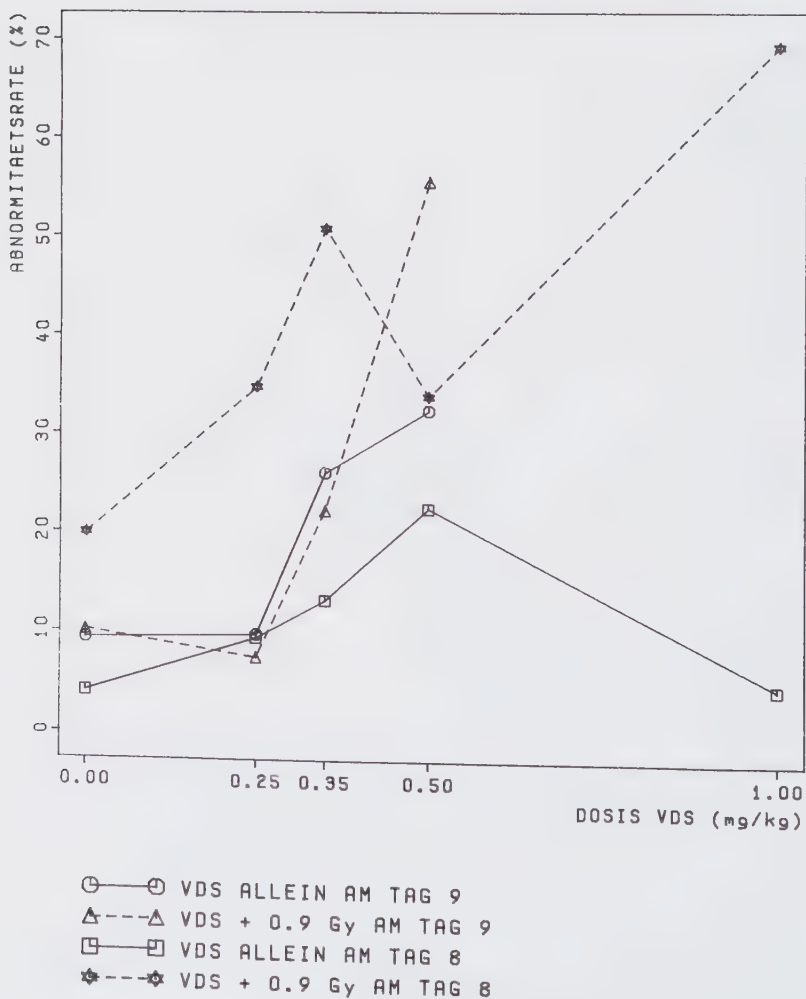
ABBILDUNGEN

Abb. 3 Vergleich der Mortalitätsraten nach Applikation von VDS allein oder zusammen mit Bestrahlung in Abhängigkeit vom Behandlungsstadium und von der VDS-Konzentration.



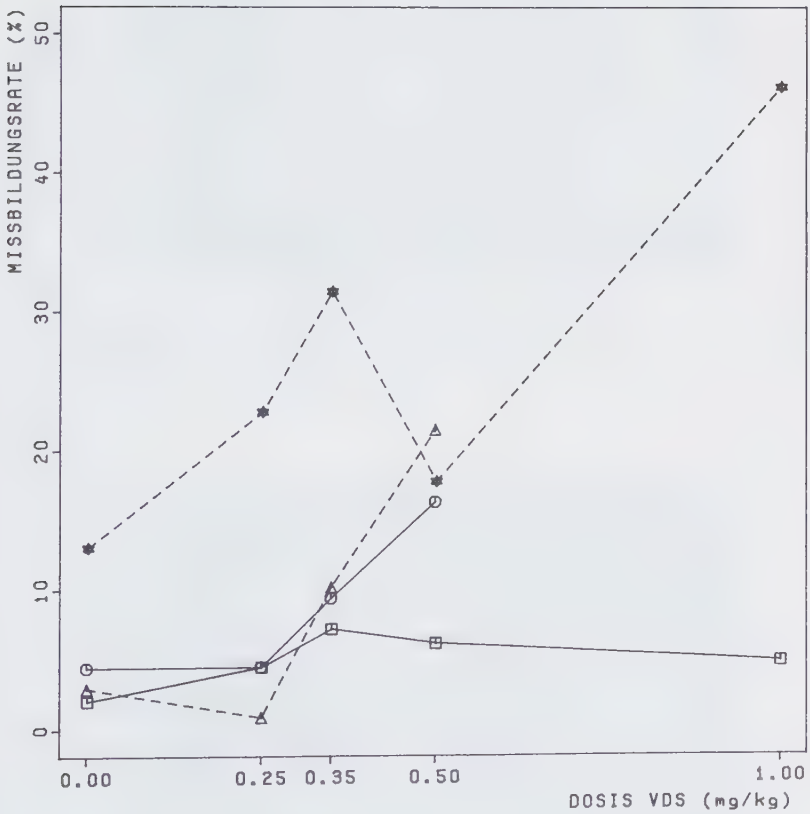
- VDS ALLEIN AM TAG 9
- △--△ VDS + 0.9 Gy AM TAG 9
- VDS ALLEIN AM TAG 8
- ☆--☆ VDS + 0.9 Gy AM TAG 8

Abb. 4 Vergleich der Abnormitätsraten⁺ nach Applikation von VDS allein oder zusammen mit Bestrahlung in Abhängigkeit vom Behandlungsstadium und von der VDS-Konzentration.



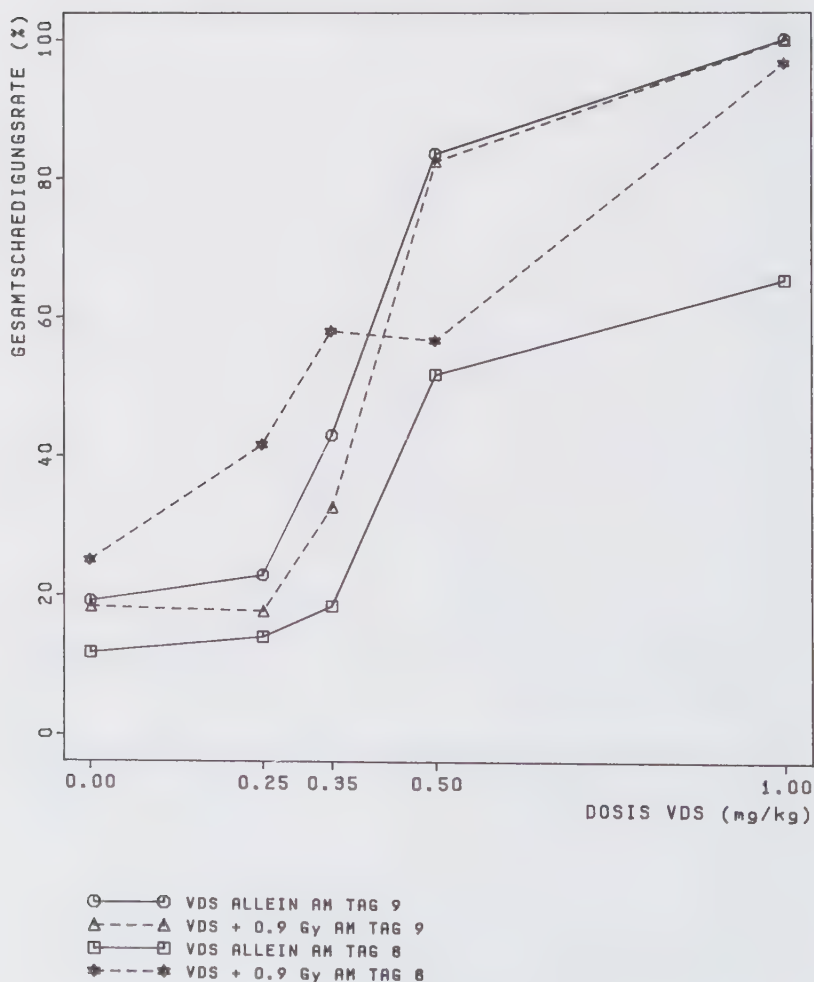
⁺ Gesamtzahl von Wachstumsretardationen und Missbildungen bezogen auf die Anzahl lebender Feten.

Abb. 5 Vergleich der Missbildungsrate nach Applikation von VDS allein oder zusammen mit Bestrahlung in Abhängigkeit vom Behandlungsstadium und von der VDS-Konzentration.



- VDS ALLEIN AM TAG 9
- △---△ VDS + 0.9 Gy AM TAG 9
- VDS ALLEIN AM TAG 8
- ☆---☆ VDS + 0.9 Gy AM TAG 8

Abb. 6 Vergleich der Gesamtschädigungsraten⁺ nach Applikation von VDS allein oder zusammen mit Bestrahlung in Abhängigkeit vom Behandlungsstadium und von der VDS-Konzentration.



⁺ Gesamtzahl toter, wachstumsretardierter und missgebildeter Feten bezogen auf die Anzahl Implantate.



Abb. 7 18-tägige Mausfeten. Links: Kontrolle. Rechts: Exencephalie und Exophthalmie nach Bestrahlung mit 0.9 Gy Röntgenstrahlen am Tag 9 der Gestation.

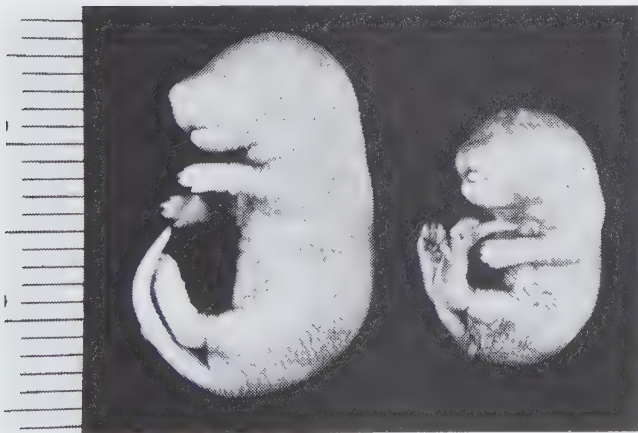


Abb. 8 18-tägige Mausfeten. Links: Kontrolle. Rechts: Wachstumshemmung, "Mopsgesicht" (Oberkiefer-Verkürzung bei gleichzeitiger Prognathie) und Anophthalmie nach Kombinationsbehandlung mit 0.5 mg/kg Vindesin und 0.9 Gy Röntgenstrahlen am Tag 8 der Gestation.



Abb. 9 18-tägige Mausfeten. Links: Kontrolle. Rechts: Wachstumsreduzierter Fet mit starken Hämorrhagien im Augenbereich sowie deformierten Hinterextremitäten (Hypodaktylie) nach Verabreichung von 0.35 mg/kg Vindesin am Tag 9 der Schwangerschaft.



Abb. 10 Polydaktylie der Vorderextremität (zusätzlicher Fingerstrahl) bei einem 18-tägigen Mausfet nach Applikation von 0.35 mg/kg Vindesin am Tag 8 der Gestation.



Abb. 11 18-tägige Mausfeten. Links: Kontrolle. Rechts: Verschiebung und Reduktion der Ohrmuschel (Mikrotie) sowie Bildung eines zusätzlichen Ohrlappens nach Kombinationsbehandlung mit 0.25 mg/kg VDS und 0.9 Gy Röntgenstrahlen am Tag 8.

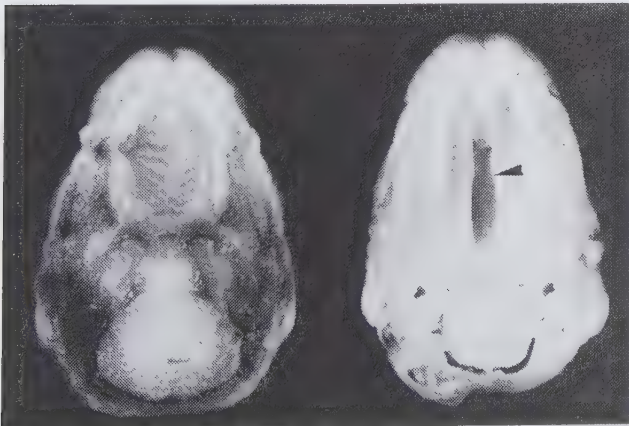


Abb. 12 Makroskopische Analyse der Mausfeten am Tag 18 mittels Rasierklingenschnitt-Technik. Schnittführung transversal durch die Mund- und Ohrenregion.
Links: Aufsicht auf ein ungeschädigtes Gaumendach. Rechts: Gaumenspalt (Wolfsrachen) nach einer Injektion von 0.5 mg/kg Vindesin am Tag 9 der Gestation.

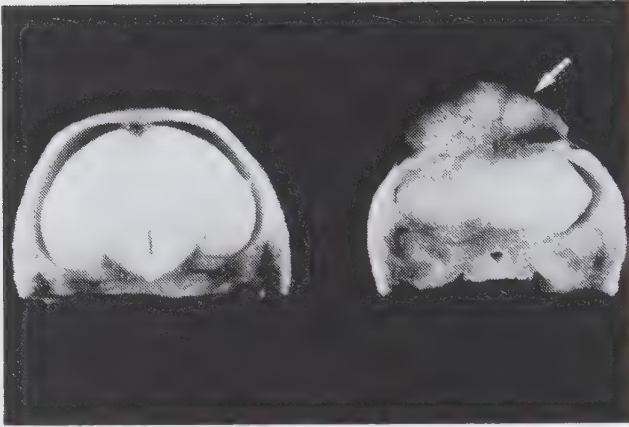


Abb. 13 Frontal geführte Rasierklingschnitte durch die Gehirnregion 18-tägiger Mausfeten.
Links: Kontrolle. Rechts: Hirnbruch (Exenzephalie) nach 0.9 Gy-Röntgenbestrahlung am Tag 8 der Gestation.

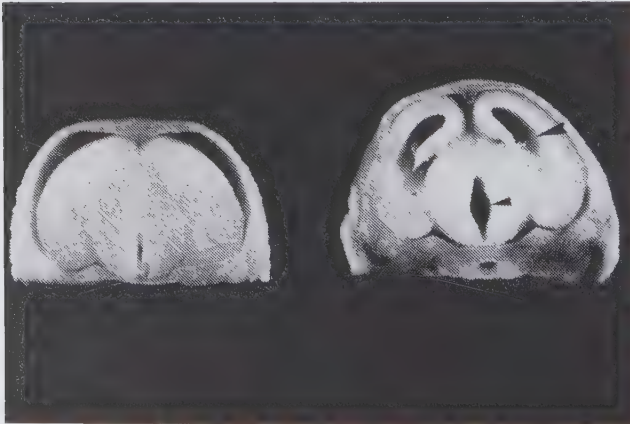


Abb. 14 Frontal geführte Rasierklingschnitte durch die Gehirnregion 18-tägiger Mausfeten.
Links: Kontrolle. Rechts: Abnorme Erweiterung der beiden Lateralventrikel und des Zentralkanals (Hydrozephalus internus) nach 0.35 mg/kg VDS und 0.9 Gy Röntgenstrahlen am Tag 8 der Gestation.

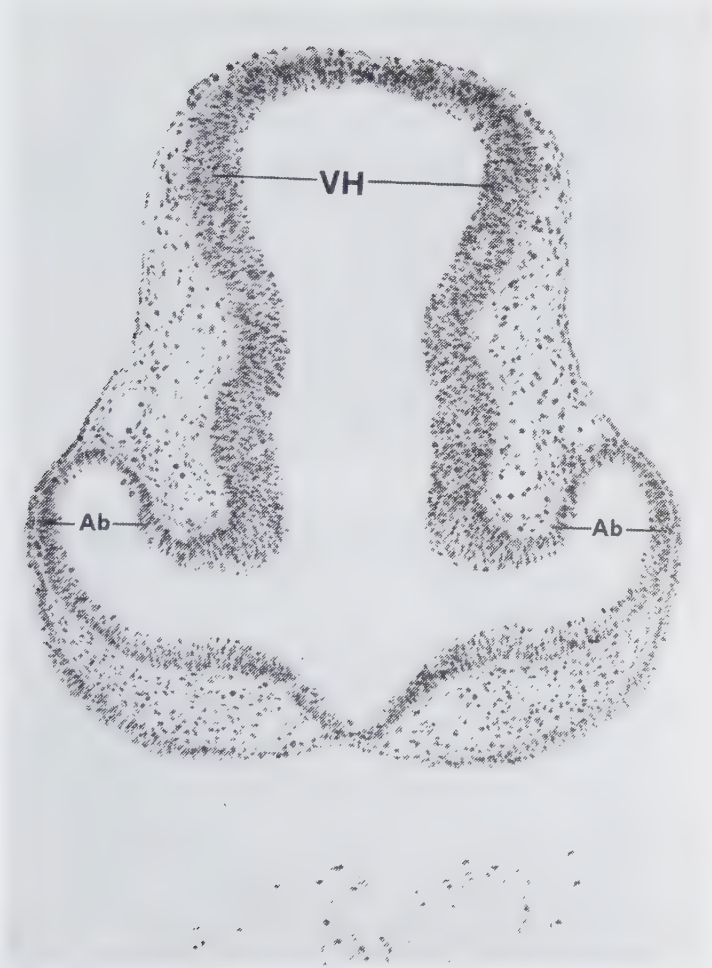


Abb. 15 Frontalschnitt durch die Kopfregion eines unbehandelten Mausembryos am Tag 9 der Gestation, Uebersichtsaufnahme (Vergr. 124 x).
VH=Vorderhimn, Ab=Augenblase



Abb. 16 Augenanlage 4 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation. (Vergr. 260 x)

- Oben: Kontrolle. Zahlreiche Mitosen in der Nähe des Augenlumens (Pfeile), Zelltod nur sporadisch auftretend.
- Unten: Massive Zerstörung der Primordialgewebes sowie praktisch vollständige Unterdrückung der Proliferationstätigkeit nach Kombinationsbehandlung mit 0.35 mg/kg Vindesin und 0.9 Gy Röntgenstrahlen.

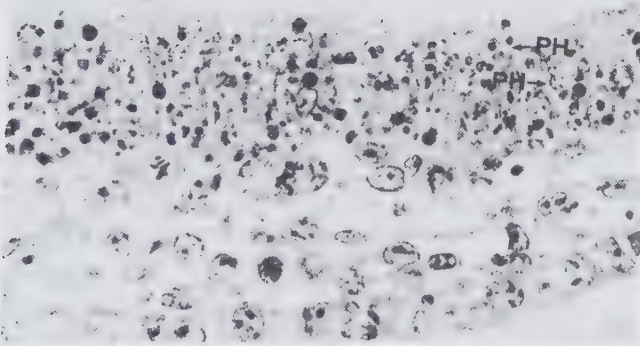
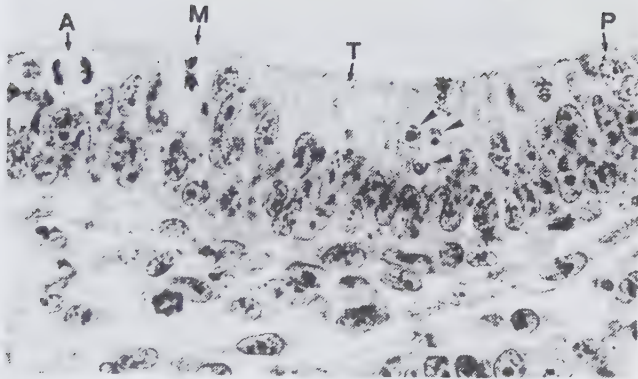


Abb. 17 Ventrale Region der Augenanlage 4 Stunden nach Behandlung, stärker vergrößert (640 x).

Oben: Kontrolle. Vereinzelte Nekrosen (Pfeilspitzen) sowie proliferierende Zellen in der Lumennähe.

P=Prophase, M=Metaphase, A=Anaphase, T=Telophase

Unten: Nur wenige überlebende Zellen nach kombinierter Anwendung von Vindesine und Bestrahlung.

PH=Phagozyt

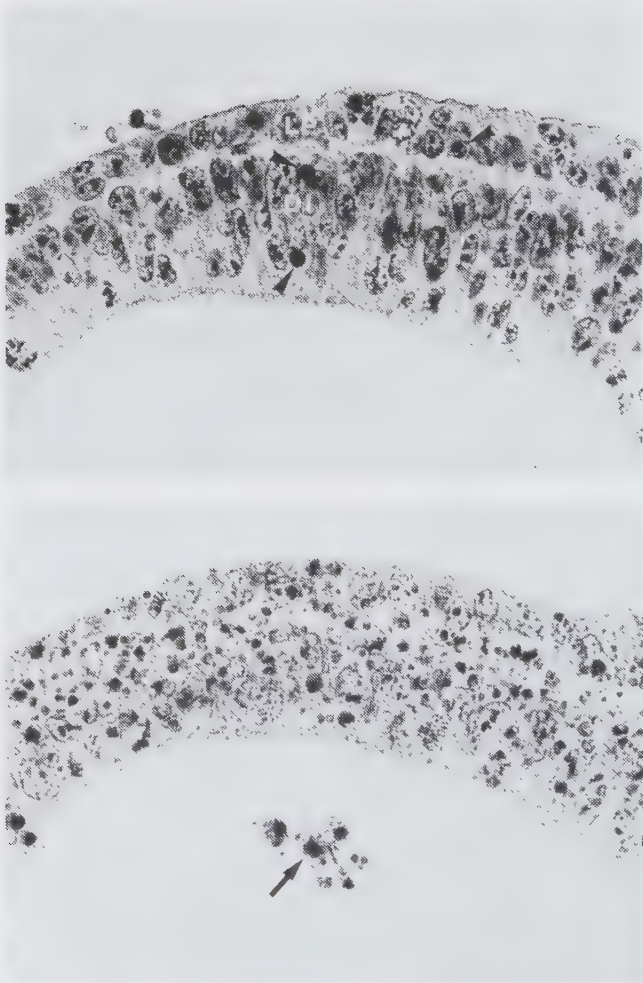


Abb. 18 Distale Region und Linsenplakode der Augenanlage 4 Stunden nach Behandlung, stärker vergrößert (640 x).

Oben: Kontrollgewebe mit vereinzelten Zellnekrosen (Pfeilspitzen).
DI=distale Augenregion, LP=Linsenplakode

Unten: Extensiver Neuroblastentod nach Applikation von 0.35 mg/kg VDS und 0.9 Gy Röntgenstrahlen. Zellüberreste auch im Augenkammer (Pfeil).

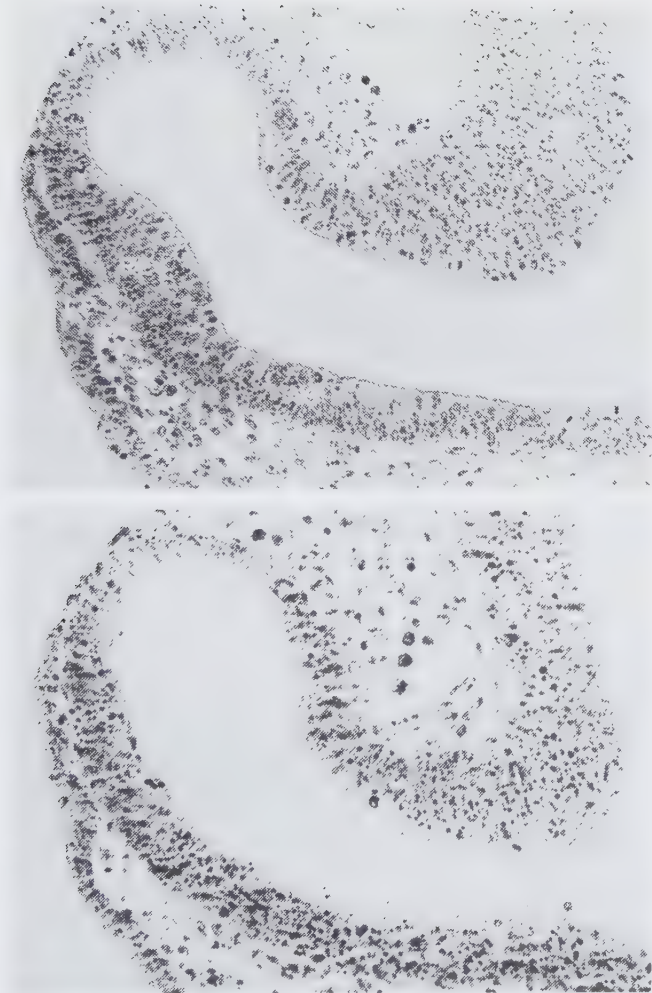


Abb. 19 Augenanlage 12 Stunden nach Behandlung am Tag 9 der Gestation (Vergr. 240 x).

Oben: Kontrolle. AS=Augenstiel, RE=Retina, LP=Linsenplakode, PZ=Pigmentzone

Unten: Vernichtung des grössten Teils der Zellpopulation, insbesondere im Bereiche des Augenstiels und der Retina, nach alleiniger Applikation von 0.35 mg/kg Vindesine.

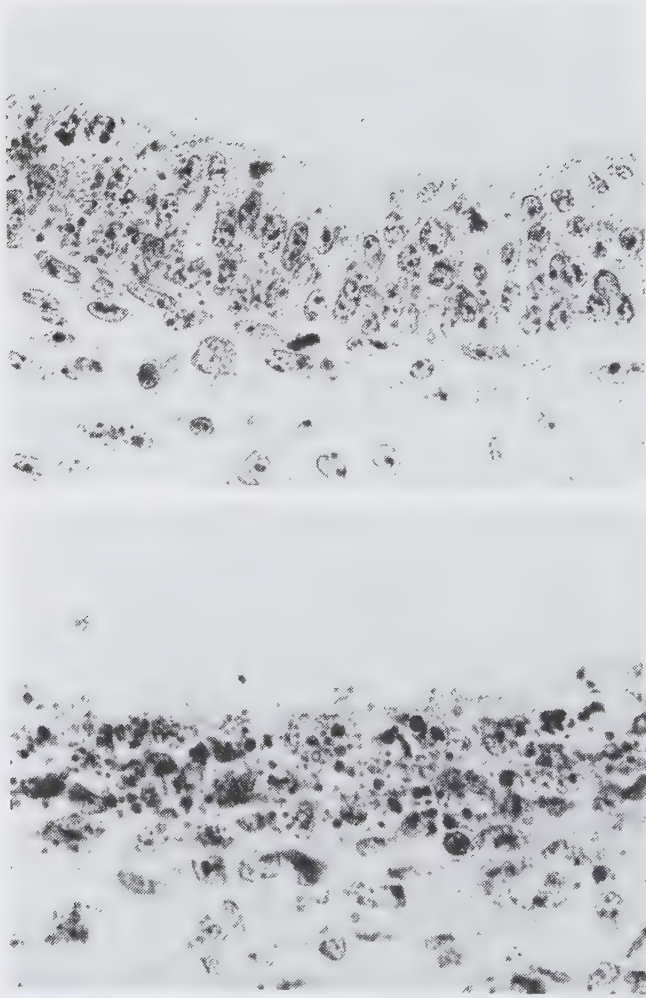


Abb. 20 Augenstiel-Bereich der Augenanlage 12 Stunden nach Behandlung, stärker vergrößert (560 x).

Oben: Kontrolle.

Unten: Maximale Zell-Letalität nach Verabreichung von Vindesine allein. Die meisten Kerne sind in kleine bis kleinste Fragmente zerfallen und der histologische Aufbau weist eine totale Desorganisation auf. Die Mächtigkeit des Primordialgewebes ist infolge der massiven Zellverluste stark verringert.

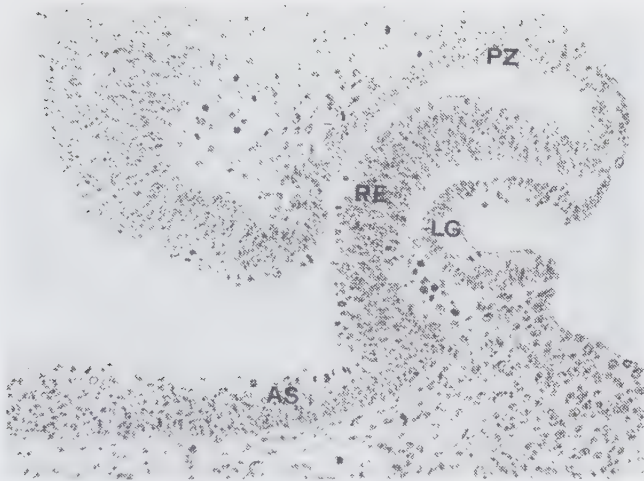


Abb. 21 Frontalschnitt durch das linke Augenprimordium eines unbehandelten Mausembryos am Tag 10 der Gestation, Uebersichtsaufnahme (Vergr. 205 x).

AS=Augenstiel, RE=Retina, LG=Linsengrube, PZ=Pigmentzone

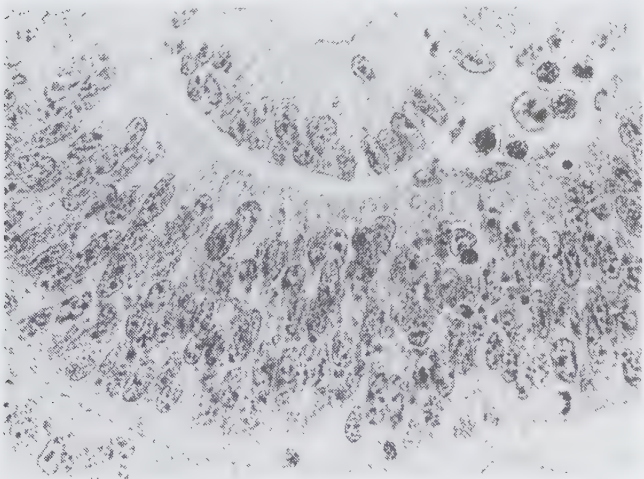


Abb. 22 Detailaufnahme der präsumptiven Netzhaut eines 10-tägigen Kontroll-embryos (Vergr. 640 x). Zelltod wie bei früheren Entwicklungsstadien auf vereinzelte Nekrosen beschränkt.

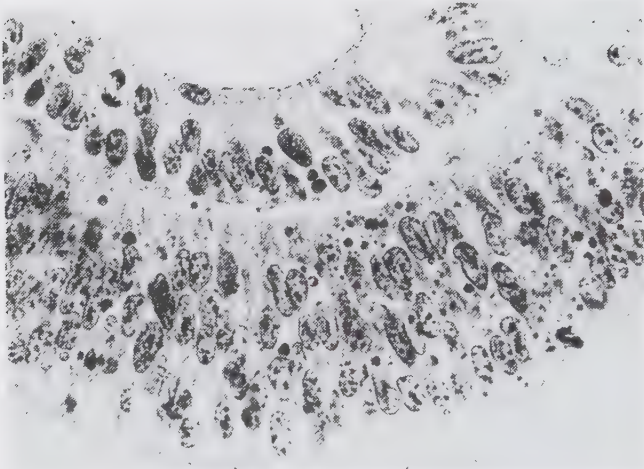


Abb. 23 Embryonale Retina 24 Stunden nach Verabreichung von Vindesin am Tag 9. Vermehrtes Auftreten von Zelldegenerationen, ein Zeichen für die anhaltende Zytotoxizität des Alkaloids. (Vergr. 640 x)

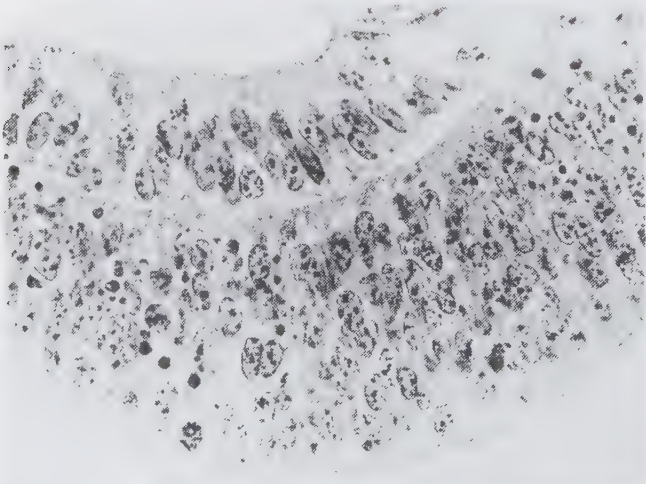


Abb. 24 Embryonale Retina 24 Stunden nach Kombinationsbehandlung mit Vindesin und Bestrahlung. Der Anteil an nekrotischem Gewebe ist kleiner als nach Applikation von Vindesin allein, eine Folge der antagonistischen Wechselbeziehung zwischen dem Zytostatikum und Röntgenstrahlen. (Vergr. 640 x)

CURRICULUM VITAE

Balla Ivan, von Winterthur (ZH), geboren am 24. Januar 1953 in Bratislava (CSSR). In Bratislava absolvierte ich auch die Primar- und Sekundarschule. 1968 nach dem russischen Einmarsch emigrierte ich mit meinen Eltern in die Schweiz (Winterthur). Noch im gleichen Jahr trat ich in die Lehramt-Abteilung der Kantonsschule Winterthur ein, die ich 1972 mit dem Maturitätszeugnis abschloss. Im Wintersemester 1972/73 nahm ich an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich das Biologiestudium auf, das ich im Winter 1978 mit dem Diplom in Zoologie beendete. Ich besuchte Vorlesungen, Kurse und Kolloquien der Dozenten R. Bachofen, J. Baker, E. Batschelet, J. Biegert, H. Briegel, H. Burla, P.S. Chen, C. Claude, C.D.K. Cook, C.H. Eugster, H. Fritz-Niggli, R. Furrer, D. Glaser, M. Greuter, H. Hediger, K.A. Hünemann, R. Hunsperger, H.R. Hohl, H. Keller, R.F. Keller, St. Kubik, E. Kuhn-Schnyder, H. Kummer, B. Nievergelt, R. Nöthiger, H.R. Oswald, D. Rast, H. Rieber, O. Rohweder, W. Scheffrahn, J. Schlittler, H. Schmid, R. Staub, P. Tardent, D.C. Turner, H. Wanner, R. Wehner, O. Woodtli und V. Ziswiler. Ab Juli 1979 bis Juli 1981 war ich als Assistent am Strahlenbiologischen Institut der Universität Zürich angestellt, wo ich auch meine Doktorarbeit durchführte.

Die vorliegende Dissertation entstand unter der Leitung von Frau Prof. Dr. H. Fritz-Niggli.

